

**Isolierung symbiosespezifischer Gene aus *Geosiphon
pyriformis* und funktionelle Charakterisierung des ersten
Glomeromycota-Zuckertransporters**

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt
zur
Erlangung des akademischen Grades
eines Doctor rerum naturalium
genehmigte
Dissertation von

Holger Martin
aus
Konstanz

Berichterstatter: PD. Dr. Arthur Schüßler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Thiel

Tag der Einreichung: 14. 11. 2005

Tag der mündlichen Prüfung: 21. 12. 2005

Darmstadt 2005

D17

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Botanik der Technischen Universität Darmstadt unter der Leitung von PD Dr. A. Schüßler durchgeführt. Die DFG förderte diese Arbeit im Rahmen des Graduiertenkollegs 340 "Kommunikation in biologischen Systemen: vom Molekül zum Organismus in seiner Umwelt".

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1 Die arbuskuläre Mykorrhiza (AM)	1
<u>Entwicklung der arbuskulären Mykorrhiza</u>	2
<u>Der bidirektionale Nährstoffaustausch in der arbuskulären Mykorrhiza</u>	3
1.2 <i>Geosiphon pyriformis</i> und seine Bedeutung als Modellsystem für die AM	7
1.3 Zuckertransport über Biomembranen	11
1.4 Ziele der Arbeit	14
<u>Etablierung von Methoden zur mRNA-Isolation und Aufbau pilzlicher cDNA-Banken</u>	14
<u>Charakterisierung symbiosespezifischer Gene und deren Produkte aus <i>Geosiphon pyriformis</i></u>	14
2. Material und Methoden	16
<u>Verwendete Abkürzungen</u>	16
2.1 Geräte	16
2.2 Software	17
2.3 Chemikalien	18
2.4 Enzyme	18
2.5 Medien	18
2.6 Puffer	21
2.7 Lösungen	22
2.8 Nukleinsäure-Marker	25
2.9 Zur Klonierung verwendete Bakterien- und Hefestämme	25
2.10 Verwendete Kits	25
2.11 Methoden	26
2.11.1 Kultivierung von <i>Geosiphon pyriformis</i>	26
2.11.2 polyA-RNA-Isolation aus <i>Geosiphon</i>	27
2.11.2.1 Präparation von <i>Geosiphon</i>-Blasen und Rohlysate-Herstellung	27
2.11.2.2 polyA-RNA-Isolation aus dem Rohlysate	27
2.11.2.3 Messung der in <i>Geosiphon</i>-Blasen enthaltenen Menge an polyA-RNA	28
2.11.2.3.1 Abschätzung durch Vergleich mit RNA-Mengen anderer Zellen	28
2.11.2.3.2 Messung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ribo Green	29
2.11.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)	31
2.11.3.1 Geschachtelte PCR (Nested-PCR)	33
2.11.3.2 Colony-PCR	33
2.11.3.3 Verwendete Primer und Oligonukleotide	34
2.11.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen	35
2.11.5 Konzentrationsmessung von doppelsträngiger DNA mit Hoechst 33258	36
2.11.6 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen	36
2.11.7 DNA-Reinigung mit Silikamembran-Säulen	37

2.11.7.1	Gelextraktion von DNA	37
2.11.7.2	Reisolation von DNA aus Restriktionsansätzen	37
2.11.8	DNA-Entsalzung und Konzentrationserhöhung mit Microcon YM-100-Mikrozentrifugationssäulen	37
2.11.9	Klonierung von DNA	38
2.11.9.1	Vektoren	38
2.11.9.2	Verknüpfung von DNA-Fragmenten (Ligation)	38
2.11.9.3	Transfektion von Vektor-DNA in kompetente Zellen	39
2.11.9.4	Klonierung mit dem TOPO-TA cloning Kit	39
2.11.10	Übernachtskulturen von <i>E. coli</i>	40
2.11.11	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	41
2.11.12	Glycerin-Dauerkulturen von <i>E. coli</i>	41
2.11.13	DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse	41
2.11.14	cDNA-Synthese mit dem „SMART-System“	42
2.11.15	Subtraktive Hybridisierung von cDNA aus im Licht bzw. im Dunkeln inkubierten <i>Geosiphon</i> -Blasen	44
2.11.16	Kontrollexperimente zur subtraktiven Hybridisierung	46
2.11.16.1	Effizienz der Adaptorligation an die Tester-cDNA	46
2.11.16.2	Rückwärtssubtraktion	47
2.11.16.3	Kontrolle der Subtraktionseffizienz: PCR-Amplifikation unsubtrahierter cDNA	48
2.11.16.4	Kontrolle der Subtraktionseffizienz: PCR-Amplifikation mit Primern für ein konstitutiv exprimiertes Gen	49
2.11.17	Differentielles Screening von cDNA aus der Vorwärtssubtraktion	49
2.11.18	Überprüfung der Resultate des differentiellen Screenings durch RT-PCR	53
2.11.18.1	Präparation und Inkubation von <i>Geosiphon</i> -Blasen	54
2.11.18.2	polyA-RNA Isolation	54
2.11.18.3	cDNA-Erststrangsynthese	54
2.11.18.4	PCR-Amplifikation mit den genspezifischen Primern	55
2.11.19	Herstellung einer gerichtet klonierten und nach Größe fraktionierten Hefe-expressions-cDNA-Bank von <i>Geosiphon pyriformis</i>	56
2.11.19.1	polyA-RNA-Isolation	56
2.11.19.2	cDNA-Synthese	56
2.11.19.3	Fraktionierung der cDNA nach der Größe	57
2.11.19.4	<i>Sfi</i> I-Restriktion der cDNA	58
2.11.19.5	Konstruktion des Hefeexpressionsvektors pDR196SFI	58
2.11.19.6	Ligation von pDR196SFI mit der <i>Geosiphon</i> -cDNA	60
2.11.19.7	Transfektion von <i>E. coli</i> mit dem Ligationsprodukt pDR196SFI::cDNA	61
2.11.19.8	Transfektionseffizienz	61
2.11.19.9	Durchschnittliche Größe der Plasmidinserts	61
2.11.19.10	Abernten der Primärbank	62
2.11.19.11	Titerbestimmung der Primärbank	62

2.11.19.12	Amplifikation der Primärbank	62
2.11.19.13	Abernten der Sekundärbank und Plasmidpräparation	63
2.11.20	Funktionelle Komplementation der Hefemutante EBY VW4000	63
2.11.20.1	Wachstumstests zur Untersuchung der Selektionsbedingungen für EBY VW4000	64
2.11.20.2	Vorbereitung von EBY VW4000 zur Transfektion	64
2.11.20.3	Ansetzen des „Transfektionsmixes“	65
2.11.20.4	EBY VW4000-Transfektion und erste Selektion der Transformanten	66
2.11.20.5	Zweite Selektion der Transformanten	66
2.11.20.6	Replattierung der Klone aus der zweiten Selektion	67
2.11.20.7	Colony-PCR mit Kolonien aus der Replattierung der zweiten Selektion	67
2.11.20.8	Plasmidpräparation aus Hefe und Retransfektion in <i>E. coli</i>	68
2.11.20.9	Glycerin-Dauerkulturen von EBY VW4000-Klonen	69
2.11.20.10	Vollängen-Sequenzierung des putativen Hexosetransporters <i>Gphxt1</i>	69
2.11.20.11	Phylogenetische Analyse von GpHXT1p	69
2.11.21	Physiologische und molekulare Charakterisierung des putativen Zucker- transporters GpHXT1p von <i>Geosiphon pyriformis</i>	69
2.11.21.1	Untersuchung der Substratspezifität von GpHXT1p durch Wachstumstests	70
2.11.21.2	Untersuchung zum Einfluss von Licht auf die Expression von <i>Gphxt1</i>	71
2.11.21.3	pH-Messungen in Hefesuspensionen zur Untersuchung des Transport- mechanismus von GpHXT1p	72
2.11.21.4	Membranpotentialmessungen in <i>Xenopus</i> -Oozyten zur Untersuchung des Transportmechanismus von GpHXT1p	74
2.11.21.4.1	Konstruktion des Oozyten-Expressionsvektors pOO2SFI	74
2.11.21.4.2	Klonierung von <i>Gphxt1</i> in pOO2SFI	76
2.11.21.4.3	cRNA-Synthese von <i>Gphxt1</i>	77
2.11.21.4.4	Denaturierende Agarosegele zur RNA-Analyse	77
2.11.21.4.5	Präparation von <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten	78
2.11.21.4.6	Injektion von <i>Gphxt1</i> -cRNA in <i>Xenopus</i> -Oozyten	79
2.11.21.4.7	Membranpotentialmessungen mit <i>Xenopus</i> -Oozyten	79
2.11.21.5	Messung der Glukoseaufnahme in <i>hxt</i> -transformierte EBY VW4000-Klone	81
2.11.21.5.1	Untersuchung der Aufnahmekinetik von GpHXT1p	82
2.11.21.5.2	Messungen zur weiteren Untersuchung der Substratspezifität von GpHXT1p	83
2.11.21.5.3	Messungen zur Untersuchung des Transportmechanismus von GpHXT1p	83
3.	Ergebnisse	84
3.1	Subtraktive Hybridisierung und differentielles Screening	84
3.1.1	Bestimmung des polyA-RNA-Gehalts von <i>Geosiphon</i> -Blasen	84
3.1.1.1	Vergleich mit dem polyA-RNA-Gehalt anderer eukaryotischer Zellen	84
3.1.1.2	Bestimmung durch Fluoreszenzspektrometrie	85
3.1.2	Herstellung der cDNA-Proben zur subtraktiven Hybridisierung	85
3.1.3	Untersuchung klonierter „SMART-cDNA“	86

3.1.4	Subtraktive Hybridisierung der cDNA-Proben	87
3.1.5	Differentielles Screening klonierter cDNA aus der Vorwärtssubtraktion	92
3.1.6	Überprüfung der durch differentielles Screening erhaltenen cDNA-Sequenzen	95
3.2.	Aufbau einer Hefeexpressions-cDNA-Bank von <i>Geosiphon pyriformis</i> und funktionelle Komplementation der Hefemutante EBY VW4000	96
3.2.1	Aufbau der Hefeexpressions-cDNA-Bank von <i>Geosiphon pyriformis</i>	96
3.2.2	Funktionelle Komplementation der Hefemutante EBY VW4000	100
3.2.2.1	Bestimmung einer zur Selektion geeigneten Glukosekonzentration	100
3.2.2.2	Transfektion von EBY VW4000 mit Plasmiden aus der <i>Geosiphon</i> -cDNA-Bank	102
3.2.2.3	PCR-Analyse positiver Klone aus der EBY VW4000-Transfektion	104
3.2.2.4	Sequenzanalyse der colony-PCR-Produkte	105
3.2.2.5	Phylogenetische Analyse von GpHXT1p	110
3.3	Physiologische und molekulare Charakterisierung des putativen Zuckertransporters GpHXT1p von <i>Geosiphon pyriformis</i>	113
3.3.1	Untersuchung der Substratspezifität von GpHXT1p	113
3.3.1.1	Untersuchung der Substratspezifität von GpHXT1p: Wachstumstests mit transformierten Hefen auf Agarmedien	113
3.3.1.2	Untersuchungen der Substratspezifität von GpHXT1p: Wachstumstests mit transformierten Hefen in Flüssigmedien	116
3.3.2	Untersuchung zum Einfluss von Licht auf die Expression von <i>Gphxt1</i>	119
3.3.3	pH-Messungen in Hefesuspensionen zur Untersuchung des Transportmechanismus von GpHXT1p	121
3.3.4	Potentialmessungen an <i>Xenopus</i> -Oozyten zur Untersuchung des Transportmechanismus von GpHXT1p	124
3.3.5	Aufnahme radioaktiv markierter Glukose in <i>Gphxt1</i> -transformierte Hefe	127
3.3.5.1	Untersuchung der Aufnahmekinetik von GpHXT1p	128
3.3.5.2	Weitere Untersuchungen zur Substratspezifität von GpHXT1p	130
3.3.5.3	Messungen zur Untersuchung des Transportmechanismus von GpHXT1p	131
4.	Diskussion	133
4.1	Herstellung und differentielles Screening einer subtraktiven cDNA Bank aus <i>Geosiphon pyriformis</i>	134
	polyA-RNA-Isolation aus <i>Geosiphon</i> und cDNA-Synthese	134
	Subtraktive Hybridisierung	136
	Differentielles Screening	136
4.2	Aufbau einer Hefeexpressions-cDNA-Bank, Isolation und Sequenzanalyse des Zuckertransportergens <i>Gphxt1</i> aus <i>Geosiphon pyriformis</i>	137
	Aufbau einer Hefeexpressions-cDNA-Bank von <i>Geosiphon pyriformis</i>	138
	Isolation und Analyse des Zuckertransportergens <i>Gphxt1</i> aus <i>Geosiphon pyriformis</i>	139
4.3	Physiologische und molekulare Charakterisierung des putativen Zuckertransporters GpHXT1p von <i>Geosiphon pyriformis</i>	143

4.3.1 Untersuchungen zur Substratspezifität von GpHXT1p	143
<u>Wachstumstests mit verschiedenen Zuckern bzw. Zuckerderivaten</u>	143
<u>Substratkompetition mit D-Glukose</u>	144
4.3.2 Untersuchung zum Einfluss von Licht auf die Expression von <i>Gphxt1</i>	145
4.3.3 Untersuchungen zum Transportmechanismus	146
<u>pH-Messungen in Hefesuspensionen</u>	146
<u>Plasmamembran-Potentialmessungen in <i>Xenopus</i>-Oozyten</u>	147
<u>Aufnahmemessungen in Gegenwart von ATPase-Hemmstoffen und Entkopplern</u>	149
<u>Untersuchung der Aufnahmekinetik</u>	149
4.4 Überlegungen zur <i>in vivo</i> Funktion von GpHXT1p in <i>Geosiphon</i>-Symbiose und Vergleich mit der AM-Symbiose	151
4.5 Ansätze zur Weiterführung des Projekts	155
<u>Isolation der kompletten genomischen Struktur von <i>Gphx1p</i></u>	155
<u>Membran-Potentialmessungen mit <i>Xenopus</i>-Oozyten zur Untersuchung der Substratspezifität und Aufnahmekinetik von GpHXT1p</u>	155
<u>Lokalisation von GpHXT1p <i>in vivo</i></u>	156
<u>Isolation weiterer Zuckertransporter aus <i>Geosiphon pyriformis</i></u>	156
<u>Isolation weiterer, symbiosespezifischer Gene aus der hier erstellten cDNA-Bank</u>	156
<u>Versuch der Isolation eines Zuckertransporters aus anderen AM-Pilzen</u>	156
5. Zusammenfassung	157
6. Literaturliste	159
7. Anhang	170
I. Annotation cDNA-Sequenzen <i>hm15-18</i>	171
II. Annotation cDNA-Sequenzen <i>hm39</i>	175
III. Annotation cDNA-Sequenzen <i>hm81</i>	179
IV. Annotation cDNA-Sequenzen <i>hm82</i>	181
8. Publikationen, Vorträge und Posterpräsentationen	183
9. Lebenslauf	184
10. Eidesstattliche Erklärung	185
Danksagung	186

1. Einleitung

Die *Geosiphon*-Symbiose ist die bislang einzige bekannte Endosymbiose eines Pilzes (*Geosiphon pyriformis*) mit Cyanobakterien (*Nostoc punctiforme*). Bei dieser Symbiose versorgt der Pilz die intrazellulär in blasenartig vergrößerten Hyphen lebenden Cyanobakterien mit anorganischen Nährstoffen. Im Gegenzug dazu erhält der Pilz Photosyntheseprodukte von den Cyanobakterien. Dabei stellt *Geosiphon pyriformis* einen Vertreter des die Mykorrhizapilze umfassenden Pilz-Phylums *Glomeromycota* dar. Die Klassifizierung von *Geosiphon pyriformis* als „AM-Pilz“ führte zu der Überlegung, dass die *Geosiphon*-Symbiose, auch aufgrund struktureller Parallelen, als Modellsymbiose für die AM dienen kann (Schüßler und Kluge, 2001). Zwischen den Symbionten in der AM erfolgt, wie in der *Geosiphon*-Symbiose, ein bidirektionaler Stoffaustausch dessen Mechanismen noch weitgehend unverstanden sind. Dies gilt insbesondere für den Kohlenstofftransport. Die AM-Symbiose spielt bei der Ernährung von etwa 80 % aller Landpflanzen eine ausschlaggebende Rolle (Smith und Read 1997). Der Begriff Mykorrhiza setzt sich aus den griechischen Wörtern *mikès* (Pilz) und *rhiza* (Wurzel) zusammen und wurde 1885 von A. B. Frank als Beschreibung einer Symbiose zwischen Pilzen und Pflanzenwurzeln eingeführt. Mykorrhizapilze unterstützen die Wasser- und Nährstoffaufnahme der Pflanzen aus dem Substrat. Sie haben unterschiedliche Erscheinungsformen, welche sich in verschiedene morphologische und funktionelle Kategorien unterteilen lassen (Smith und Read 1997). Die Ektomykorrhiza und Ektendomykorrhiza treten vor allem bei Gymnospermen und Angiospermen in den gemäßigten Breiten auf (Jacksons und Mason 1984). Die AM ist eine ubiquitäre Symbiose, die bei der überwiegenden Mehrheit aller Gefäßpflanzen, inklusive der *Pteridophyta*, auftritt. Auch viele Bryophyten bilden eine AM-Symbiose aus (Peterson et al., 1981, Schmid und Oberwinkler 1993, Smith und Read 1997, Trappe 1987).

In dieser Arbeit wurde auf molekularer Ebene untersucht, auf welche Art und Weise *Geosiphon pyriformis* die von *Nostoc punctiforme* bereitgestellten Photosyntheseprodukten aufnimmt. Dabei wird aus verschiedenen Gründen (siehe 1.1) angenommen, dass die molekularen Mechanismen dieses Nährstoffaustausches denen bei der AM-Symbiose entsprechen bzw. sehr ähnlich dazu sind. *Geosiphon* sollte daher als Modell zur Identifikation von für den Stofftransport relevanten AM-Pilz-Schlüsselgenen genutzt werden können.

1.1 Die arbuskuläre Mykorrhiza (AM)

Die arbuskuläre Mykorrhiza (AM) ist eine weit verbreitete und ökologisch wichtige Symbiose zwischen Pflanzen und Pilzen aus dem Phylum *Glomeromycota*. Es wird geschätzt, dass ca. 80 % aller Landpflanzen eine Symbiose mit AM-Pilzen eingehen. Die AM ist eine der ältesten Symbiosen überhaupt und lässt sich anhand von Wurzel-Fossilien bis ins Devon (vor ca. 400 Millionen Jahren; Taylor et al., 1995) bzw. anhand fossiler AM-Pilzsporen bis in das

Ordovizium (vor ca. 460 Millionen Jahren) zurückverfolgen (Redecker et al., 2000). Die AM-Pilze sind obligat biotroph und entwickelten sich in Koevolution mit den Landpflanzen. Es wird spekuliert, dass die AM den Landgang der Pflanzen (vor ca. 700 Millionen Jahren) erst ermöglichte (Schüßler et al., 2002). Somit erklärt sich das ubiquitäre Vorkommen der AM im Pflanzenreich, einschließlich der *Bryophyta*, *Pteridophyta* und *Lycophyta*. Ein wesentliches Merkmal der AM ist der Austausch von Nährstoffen zwischen den Symbionten. In der Hauptsache handelt es sich dabei um Kohlenhydrate und Phosphat (Smith und Read, 1997). Ein Teil der von der Pflanze photosynthetisch erzeugten Kohlenhydrate wird in die Wurzeln transportiert und dort an den Pilz abgegeben. Im Gegenzug nimmt der Pilz Phosphat aus dem Boden auf, transportiert es in die Wurzel und stellt es damit der Pflanze zur Verfügung. Der Pilz bildet mit seinen Hyphen im Boden ein Hyphennetz, in welchem die Nährstoffe von und zu der Pflanze transportiert werden. Dank der AM kann die Pflanze ein größeres Bodenvolumen als Nährstoffquelle erschließen als es allein durch ihre Wurzeln möglich wäre. Weitere positive Effekte der AM-Symbiose für die Pflanze sind die Erhöhung der Resistenz gegen Wurzelschädlinge wie z.B. Nematoden und pathogene Pilze (Azcon-Aguilar und Barea 1996) sowie eine höhere Widerstandskraft gegen Schadstoffe, insbesondere Schwermetalle (Hildebrandt et al. 1999). Die Vergrößerung der absorbierenden Oberfläche durch das Pilzmyzel verbessert zudem die Versorgung der Pflanze mit Wasser. Außerdem scheint das AM-Myzel den Boden zu stabilisieren und dadurch der Erosion entgegen zu wirken. Dabei spielt wahrscheinlich das von den Hyphen ausgeschiedene Glykoprotein Glomalin eine Rolle, welches die Bodenstruktur durch Verkleben zusammenhält und den Erdpartikeln eine gewisse Hydrophobizität verleiht (Requena und Breuninger 2004; Wright und Upadhyaya 1996). Während die meisten Pflanzen unter guten Umweltbedingungen auch ohne den Pilzpartner leben können, sind die AM-Pilze jedoch obligat symbiotisch.

Entwicklung der arbuskulären Mycorrhiza

Die Keimung der AM-Pilzsporen kann zunächst auch ohne die Gegenwart einer Pflanzenwurzel erfolgen. Die dabei gebildeten coenocytischen Hyphen zeigen zunächst nur ein begrenztes Wachstum. In Gegenwart von Wurzelexsudaten potentieller Symbiosepartner beschleunigen sich Wachstum und Verzweigung der Hyphen jedoch stark (Tamasloukht et al., 2003). Nach Kontakt der Hyphen mit der Wurzel bildet sich ein Appressorium, welches die Wurzeloberfläche durchdringt. Die Wände aneinander angrenzender Zellen weichen dabei auseinander und ermöglichen es den Hyphen die Rhizodermis, Exodermis und die äußeren Zellen der Wurzelrinde inter- und intrazellulär zu durchwachsen (Hause und Fester, 2005). Nach Penetration von Zellen der Wurzelrinde differenzieren sich die intrazellulären Hyphen zu den so genannten Arbuskeln, welche dieser Form der Mykorrhiza ihren Namen geben. Bei der Kolonisierung der Zellen des Wurzelkortex durch die Arbuskeln werden zwei Typen unterschieden. Der erste ist der so genannte *Arum*-Typ. Bei der Bildung dieses Typs

verzweigen sich die Hyphen nach Penetration einer Zelle durch dichotome Teilung zu einem fein verzweigten Arbuskel (Hause und Fester, 2005). Dabei findet das Wachstum der übrigen Hyphen vor allem interzellulär statt. Der zweite Typ ist der so genannte *Paris*-Typ. Bei diesem Typ bilden die Hyphen in der penetrierten Zelle schleifenförmige Gebilde (coils) aus. Die übrigen Hyphen wachsen dabei kaum interzellulär sondern breiten sich durch Wachstum von Zelle zu Zelle im Wurzelkortex aus (Requena und Breuninger 2004). Die Bildung eines Arbuskels geschieht ohne die Plasmamembran der Pflanzenzelle zu verletzen. Ein Arbuskel ist eine relativ kurzlebige Struktur die nach ca. 4-10 Tagen kollabiert (Sanders et al., 1977) und dann von der Pflanze abgebaut und resorbiert wird. Danach stellt die Pflanzenzelle ihre ursprüngliche Morphologie wieder her (Jacquelinet-Jeanmougin et al., 1987). Ein und dieselbe Wurzelrindenzelle kann somit mehrfach von einem Arbuskel kolonisiert werden (Hause und Fester 2005). In einer späteren Phase der Symbiose werden dann bei vielen, jedoch nicht allen, AM-Pilzen die so genannten „Vesikel“ gebildet, weshalb die AM-Mycorrhiza früher auch als „vesikulär-arbuskuläre Mycorrhiza“ (VAM) bezeichnet wurde. Die Vesikel werden am intraradikalen Myzel (IRM) gebildet und dienen hauptsächlich der Speicherung von Lipiden welche aus den aufgenommenen Kohlenhydraten gebildet wurden (Smith und Read 1997). Im Bereich des extraradikalen Myzels (ERM) werden Sporen gebildet welche nach Keimung die Wurzeln weiterer Pflanzen kolonisieren können. Eine schematische Darstellung der AM-Symbiose ist in Abb. 1 gezeigt.

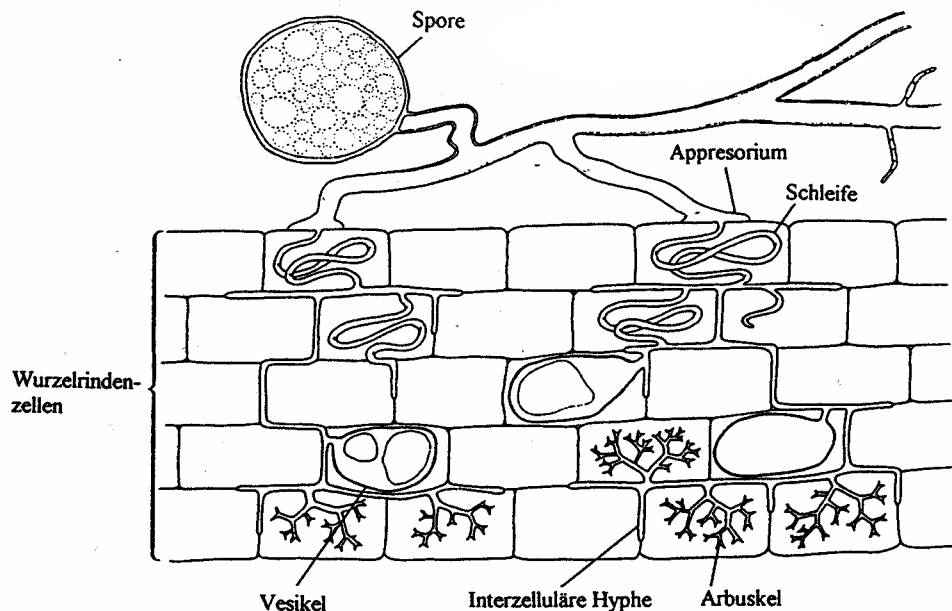


Abb. 1: Schematische Darstellung der arbuskulären Mycorrhiza (verändert aus: Isaacs 1992)

Der bidirektionale Nährstoffaustausch in der arbuskulären Mycorrhiza

Der Austausch von Nährstoffen zwischen den Symbionten ist zwar nicht der einzige Vorteil den die AM-Symbiose bietet, kann aber wohl als der wichtigste bezeichnet werden. Dabei spielt für die Pflanze das vom Pilz gelieferte Phosphat eine wichtige Rolle. Phosphat ist

im Boden zumeist in Form von schwerlöslichen Komplexen vor. Durch die Phosphataufnahme der Pflanze verarmt der Bereich um die Wurzel relativ schnell an diesem für das Pflanzenwachstum essentiellen Nährstoff. Das extraradikale Myzel (ERM) der AM-Pilze entwickelt im Boden ein weit verzweigtes System welches in der Lage ist Phosphat aus Bodenbereichen aufzunehmen welche weit außerhalb des Einzugsbereiches der Pflanzenwurzeln liegen. Die AM-Pilze wiederum sind obligat symbiotisch und zeigen keine saprophytische Lebensweise. Es konnte zudem gezeigt werden, dass das ERM nicht in der Lage ist Zucker aus der Umgebung aufzunehmen (Pfeffer et al., 1999). Somit sind die AM-Pilze zur Versorgung mit Kohlenhydraten vollständig auf die Pflanze angewiesen. Es wird geschätzt, dass zum Teil mehr als 20% der Photosyntheseassimilate von mykorrhizierten Pflanzen an den Pilz geliefert werden (Jakobsen 1995, Requena und Breuninger, 2004). Diese „Kohlenstoffkosten“ der Pflanze können als eine Investition betrachtet werden, um in nährstoffarmen Böden eine bessere Versorgung mit anorganischen Nährstoffen zu gewährleisten. Die molekulare Untersuchung dieses bidirektionalen Nährstoffaustausches zwischen den Symbionten ist ein wesentlicher Aspekt zum Verständnis der AM-Symbiose. Allerdings sind die daran beteiligten Mechanismen noch weitgehend unverstanden. Als Ort des Austauschs kommen zwar prinzipiell auch die interzellulären Hyphen in Frage. Es ist aber wahrscheinlicher, dass dies am Arbuskel geschieht (Sanders et al., 1977; Smith et al., 2000). Dieser wird daher als „symbiotisches Organ“ der AM-Symbiose bezeichnet.

Nach Etablierung eines Arbuskels füllt dieser den größten Teil der Wurzelkortezelle aus. Die den Arbuskel umhüllende, pflanzliche Plasmamembran wird als „periarbuskuläre Membran“ (PAM) bezeichnet und weist Eigenschaften auf, welche sie von der „normalen“ Plasmamembran einer Wurzelrindenzelle unterscheidet. Eine wesentliche Veränderung ist eine erhöhte H^+ -ATPase-Aktivität (Gianinazzi-Pearson et al., 1991; Requena et al., 2003). Diese dient wohl der durch Guttenberger (2000) nachgewiesenen Ansäuerung des periarbuskulären Raumes zwischen PAM und Arbuskel-Plasmamembran. Dieser periarbuskuläre Raum und die beiden begrenzenden Plasmamembranen werden auch als „symbiotisches Interface“ oder „symbiotische Grenzfläche“ bezeichnet. Der periarbuskuläre Raum enthält auf der pflanzlichen Seite Substanzen. Dies sind Pektine, Xyloglukane, nichtveresterte Polygalakturone, Arabinogalaktane, und hydroxyprolinreiche Glykoproteine (Balestrini et al., 1994; Perotto et al., 1994; Bonfante und Perotto, 1995). Diese Bestandteile werden aber nicht zu einer Sekundärwand zusammengefügt sondern verbleiben im amorphen Zustand einer primären Zellwand (Hause und Fester, 2005). Auch die Zellwand des Pilzes ist im Bereich des Arbuskels dünner als am übrigen Myzel (Requena und Breuninger, 2004). Eine schematische Darstellung eines Arbuskels ist in Abb. 2 gezeigt.

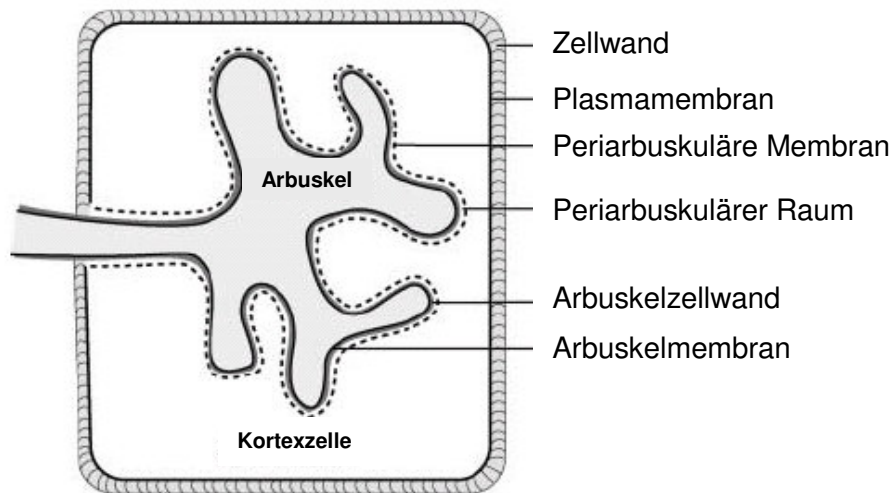


Abb. 2: Schematische Darstellung eines Arbuskels in einer Wurzel-Kortezelle (verändert aus: Harrison et al., 2002).

Beim Austausch von Phosphat wird dieses vom Pilz zunächst am ERM mittels integraler Membrantransportproteine aufgenommen. Zwei solcher Phosphattransporter konnten aus *Glomus intraradices* und *Glomus vesiforme* isoliert werden (Harrison und van Buuren, 1995; Maldonado-Mendoza et al., 2001). Das aufgenommene Phosphat wird dann, vermutlich in Form von Polyphosphaten (Harrison et al., 2002), in das intraradikale Myzel (IRM) transportiert und dort in den periarbuskulären Raum abgegeben. Rausch et al., (2001) und Harrison et al. (2002) konnten pflanzliche Phosphattransporter identifizieren die spezifisch nur in der PAM exprimiert werden. Diese dienen vermutlich zur Aufnahme des vom Pilz gelieferten Phosphats. Die Mechanismen des Kohlenhydrataustauschs hingegen sind weniger gut untersucht. Die von der Pflanze photosynthetisch erzeugten Kohlenhydrate werden zunächst in die Wurzeln transportiert. Ein Teil davon wird vermutlich in Form von Saccharose oder Hexosen in den periarbuskulären Raum abgegeben. Auch die von einigen Pflanzen als Transportform von Kohlenhydraten genutzten Polyole (Watari et al., 2004) könnten hierbei eine Rolle spielen. Unklar ist noch, inwieweit aktive Prozesse an der Abgabe dieser Kohlenhydrate eine Rolle spielen, oder ob dies nur durch Diffusion geschieht. Eine weitere Möglichkeit wäre auch, dass die in der eingangs erwähnten primären Zellwand enthaltenen Zucker vom Pilz zur Ernährung genutzt werden. Für die Pilzseite konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von Kohlenhydraten in Form von Hexosen erfolgt (Shachar-Hill et al., 1995; Solaiman und Saito, 1997; Bago et al., 2003). Die Vermutung, dass es sich dabei hauptsächlich um Glukose und Fruktose handelt (Saito et al., 1995; Shachar-Hill et al., 1995; Pfeffer et al., 1999; Requena und Breuninger) wird durch die Gegenwart saurer Invertasen im Apoplasten unterstützt (Dehne 1986; Farrar und Lewis 1987; Snellgroove et al., 1987). Invertasen spalten die von den meisten Pflanzen als Transportform für Kohlenhydrate genutzte Saccharose in Glukose und Fruktose und Pilze besitzen aktive und

passive Systeme für die Aufnahme von Zuckern (Blumenthal 1976; Lagunas 1993). Unbekannt ist jedoch, welches der beiden Transportsysteme in der AM verwendet werden könnte. Der passive Mechanismus wäre denkbar, da die aufgenommenen Hexosen im IRM sofort zu Lipiden (Triacylglyceride), Glykogen und Trehalose umgesetzt werden (Shachar-Hill et al., 1995; Pfeffer et al., 1996, Pfeffer et al., 2001, Bago et al., 2003). Somit würde stets ein Gradient für Hexosen über die Membran aufrechterhalten. Es wird jedoch allgemein angenommen, dass die Aufnahme von Hexosen durch sekundär aktiven Transport im Symport mit Protonen erfolgt (Smith et al., 1994; Hause und Fester, 2005). Dazu dient vermutlich die eingangs bereits erwähnte Ansäuerung des Apoplasten im Bereich um die Arbuskel. Dazu notwendige H^+ -ATPasen konnten bisher nur auf Pflanzenseite nachgewiesen werden (Gianinazzi-Pearson et al., 2000). Ein Transporter, welcher die Aufnahme von Zuckern über die Pilzmembran des intrazellulären Myzels oder Arbuskels ermöglicht, konnte bisher jedoch nicht identifiziert werden. Wie bereits erwähnt, werden im IRM aus den aufgenommenen Hexosen Lipide und Glykogen synthetisiert. Diese Substanzen werden dann in das ERM exportiert (Pfeffer et al., 1999; Pfeffer et al., 2001, Bago et al., 2003) und dort, dem Bedarf entsprechend, entweder gespeichert oder wieder zu Hexosen umgesetzt. Die Hexosen können dann direkt metabolisiert oder zu Trehalose, Glykogen, oder Chitin umgesetzt werden. Eine schematische Übersicht über den Kohlenstoffaustausch zwischen IRM und ERM ist in Abb. 3 gezeigt.

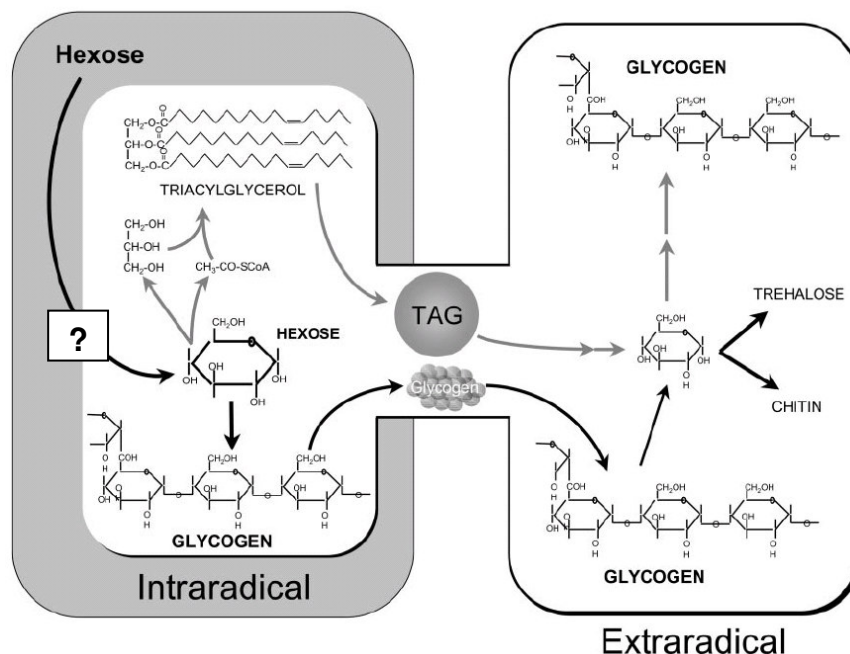


Abb. 3: Schematische Darstellung des Kohlenstoffaustausches zwischen dem intraradikalen- und dem extraradikalen Myzel in der AM-Symbiose (verändert aus: Bago et al., 2003).

Aufgrund ihrer weltweiten Verbreitung und der ökologischen und landwirtschaftlichen Bedeutung besteht ein erhebliches Interesse an der Funktion der AM-Symbiose. Dennoch

sind die Mechanismen, welche an der Etablierung und Aufrechterhaltung der Symbiose beteiligt sind, immer noch weitgehend unverstanden. Es wird geschätzt, dass durch die AM-Symbiose weltweit pro Jahr ca. $5 \cdot 10^9$ Tonnen an Kohlenhydraten ausgetauscht werden. Somit wird deutlich, dass insbesondere die Identifikation und Charakterisierung eines pilzlichen Zuckertransporters einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Symbiose liefern würde.

1.2 *Geosiphon pyriformis* und seine Bedeutung als Modellsystem für die AM

Die *Geosiphon*-Symbiose ist die bislang einzige bekannte Endosymbiose eines Pilzes (*Geosiphon pyriformis*) mit Cyanobakterien (*Nostoc punctiforme*). Das Habitat der Symbiose sind feuchte Böden, die arm an anorganischen Nährstoffen, insbesondere Phosphat, sind. Dort lebt *Geosiphon* auf der Oberfläche sowie in den oberen Bodenschichten, oft in einer Pflanzengemeinschaft mit dem Hornmoos *Anthoceros*, dem Lebermoos *Blasia* und dem Laubmoos *Dicranella* (Kluge et al. 2002, Schüßler und Kluge 2001, Schüßler und Wolf 2005). Die symbiotische Natur des Systems wurde zuerst durch F. v. Wettstein (1915) erkannt. Er beschrieb *Geosiphon* als Symbiose zwischen einer siphonalen Alge und *Nostoc*. Erst Knapp erkannte 1933, dass es sich bei dem Makrosymbionten um einen Pilz handelt. Die Ausbildung der Symbiose geschieht durch Inkorporation frei lebender *Nostoc*-Zellen in wachsende Hyphenspitzen. Dabei werden keine einzelnen Zellen aufgenommen, vielmehr werden aus einer Zellkette, dem so genannten Filament, die Zellen welche sich zwischen zwei Heterozysten befinden, „ausgeschnitten“. Nachdem *Nostoc* in die Hyphe aufgenommen wurden, schwillt diese an und bildet die charakteristische, blasenförmige Struktur welche eine Länge von bis zu 2 mm erreichen kann und sich zum größten Teil über dem Substrat befindet (Abb. 4). Die eingeschlossenen *Nostoc*-Zellen teilen sich und erreichen dabei ein Mehrfaches der Größe freilebender *Nostoc*-Zellen, sind aber strukturell sehr ähnlich zu diesen aufgebaut (Schüßler und Kluge, 2001). Innerhalb einer solchen *Geosiphon*-Blase befinden sich die *Nostoc*-Zellen in einem vom Pilz gebildeten Kompartiment, dem so genannten Symbiosom. Dieses ist in den oberen zwei Dritteln einer Blase im Wandbereich lokalisiert. Der basale, normalerweise von Erde umgebene Teil der Blase ist meist durch Ansammlung von Fettröpfchen weiß gefärbt. Das Innere einer Blase wird zu einem großen Teil von pilzlichen Vakuolen ausgefüllt (Schüßler und Kluge 2001).

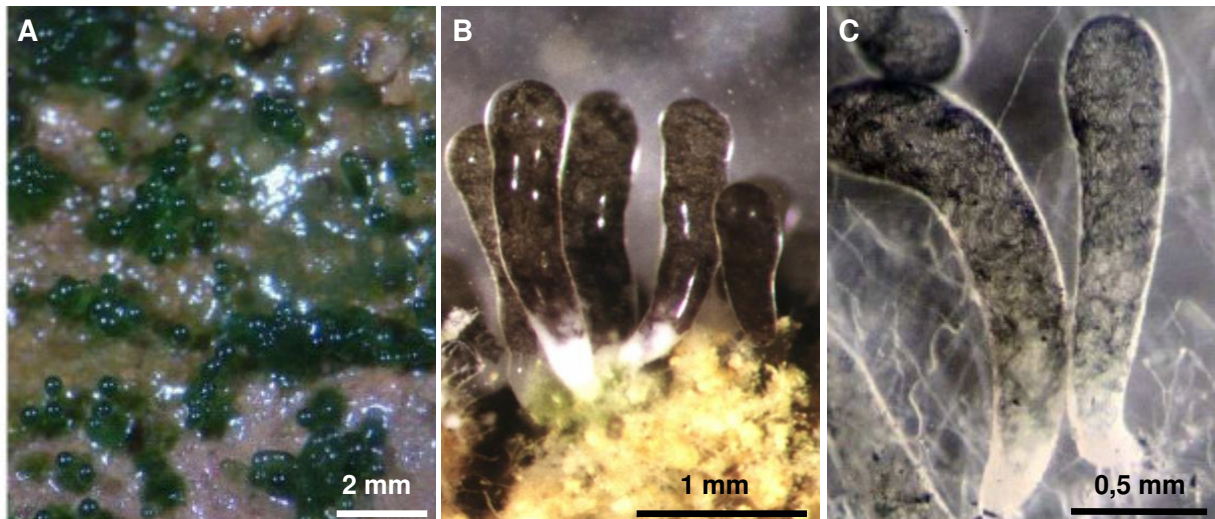


Abb. 4: **A** und **B:** *Geosiphon pyriformis* auf Erdkultur. **C:** Präparierte *Geosiphon*-Blasen in Flüssigmedium, innerhalb der Blasen sind die *Nostoc*-Filamente zu erkennen (die Fotos wurden freundlicherweise von E. Wolf und A. Schüßler zur Verfügung gestellt).

Bei der Inkorporation der *Nostoc*-Filamente werden keine Heterocysten aufgenommen, diese bilden sich innerhalb der Blase neu. Es wird angenommen, dass die endosymbiontischen *Nostoc* somit auch in der Lage sind Stickstoff zu fixieren (Schüßler und Kluge, 2001). Die photosynthetische Aktivität von *Nostoc* im Symbiosom wurde bereits von Kluge et al. (1991) mittels ^{14}C -Markierungsexperimenten nachgewiesen. Die Hauptprodukte sind dabei phosphorylierte Verbindungen und Oligosaccharide, darunter Trehalose und Raffinose. Es wird nun angenommen, dass zwischen beiden Symbionten ein reger Stoffaustausch besteht. Dabei versorgt der Pilz die Cyanobakterien mit anorganischen Nährstoffen wie Phosphat und Wasser, die Cyanobakterien wiederum versorgen den Pilz mit Photosyntheseprodukten und fixiertem Stickstoff (Schüßler und Kluge, 2001). Dieser Nährstoffaustausch muss wahrscheinlich auch am Symbiosom erfolgen, da nur hier die Plasmamembranen beider Symbionten in engem Kontakt stehen. Ultrastrukturelle Untersuchungen (Schüßler et al., 1996) ergaben, dass der Zwischenraum zwischen *Nostoc* und *Geosiphon* ca. 40 nm dick und mit einer amorphen Substanz gefüllt ist. Von dieser wurde früher angenommen, dass sie aus cyanobakteriellem Schleim besteht. Es konnte aber gezeigt werden, dass diese Schicht unter anderem Chitin enthält und somit eine rudimentäre pilzliche Zellwand darstellt. Diese ist vergleichbar mit der pilzlichen Zellwand eines Arbuskels. Zwischen der symbiotischen Kontaktfläche in der AM- und der *Geosiphon*-Symbiose bestehen eine Reihe von Ähnlichkeiten, wie z.B. die Schichtdicke von ca. 40 nm, die amorphe Struktur, und das Vorhandensein einer rudimentären Pilz-Zellwand. Bei der AM-Symbiose konnte gezeigt werden, dass die pilzliche Zellwand im Vergleich mit dem Myzel außerhalb des Arbuskels wesentlich dünner ist (Requena und Breuninger, 2004; Schüßler et al., 1996; Bonfante et al., 1990). Im Fall der *Geosiphon*-Symbiose konnte gezeigt werden, dass auch die äußere Begrenzung der *Nostoc*-Zellen reduziert ist. Auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen

kann die *Nostoc*-Zellwand noch erkannt werden, die äußere Membran des gram-negativen Cyanobakteriums *Nostoc* hingegen ist kaum noch nicht zu erkennen (Schüßler et al., 1996). Ein wesentlicher Unterschied ist allerdings, dass in der *Geosiphon*-Symbiose der Pilz der Makrosymbiont, in der AM-Symbiose aber der Mikrosymbiont ist. Eine schematische Darstellung einer *Geosiphon*-Blase und ein Vergleich der symbiotischen Kontaktfläche mit der AM-Symbiose sind in Abb. 5 gezeigt.

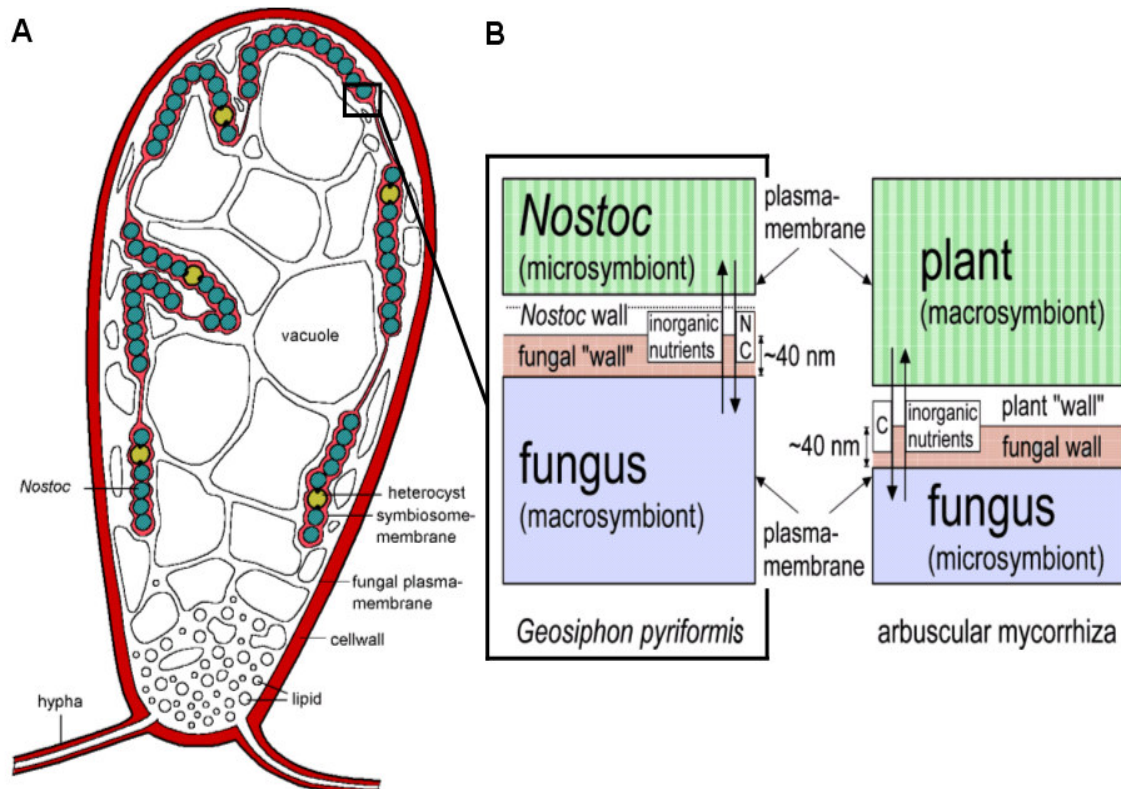


Abb. 5: **A:** Schematische Darstellung der Kompartimente einer *Geosiphon*-Blase. **B:** Strukturvergleich zwischen den symbiotischen Kontaktflächen in der *Geosiphon*- und der AM-Symbiose (aus: Schüßler und Kluge 2001).

Weiterhin ergaben sich Hinweise auf eine enge Verwandtschaft von *Geosiphon pyriformis* mit den AM-Pilzen aus der Morphologie der von *Geosiphon* als Dauerorgane gebildeten, weißlichen Sporen mit einem Durchmesser von etwa 250 µm. Durch den Vergleich morphologischer und ultrastruktureller Eigenschaften der Sporen von *Geosiphon pyriformis* und *Glomus versiforme* konnte gezeigt werden, dass die *Geosiphon*-Sporen die typischen Merkmale bestimmter AM-Pilze aufweisen (Schüßler et al. 1994). Weitere Analysen von Genen für die 18 S rRNA ergaben, dass *Geosiphon pyriformis* einen ursprünglichen Vertreter der *Glomeromycota* repräsentiert (Gehrig et al., 1996; Schüßler et al., 2001; Schüßler 2002). Eine Übersicht über die Taxonomie der *Glomeromycota* und *Geosiphon pyriformis* ist in Abb. 6 dargestellt.

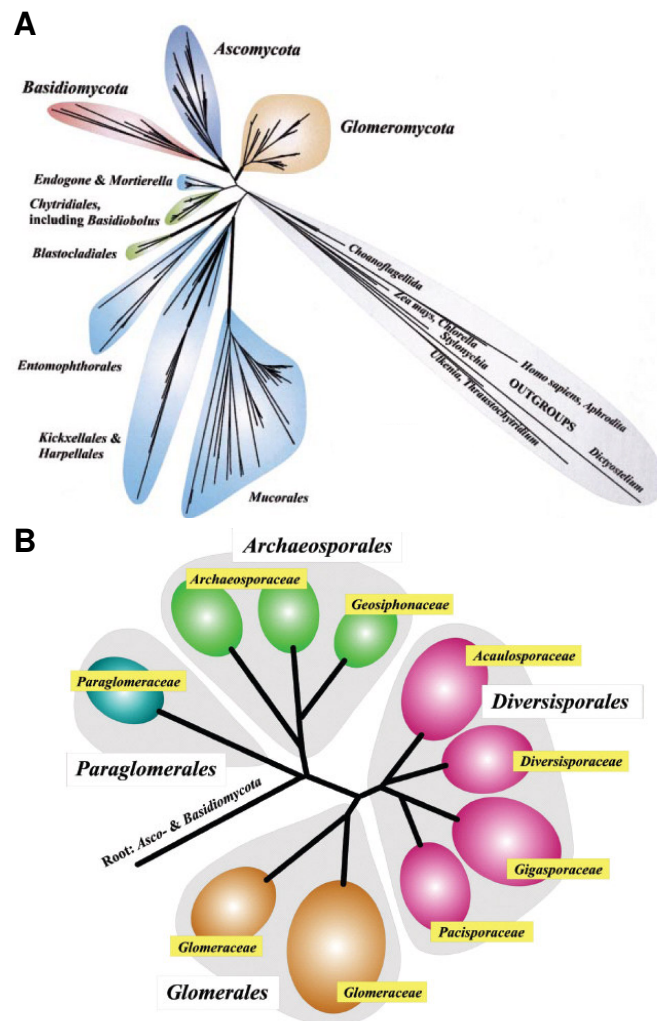


Abb. 6: **A:** Phylogenetischer Stammbaum des Pilzreiches, der aus der Analyse von 18S rRNA Genen abgeleitet wurde. Die *Zygomycota* und *Chytridiomycota* sind nicht monophyletisch, daher wird zu den einzelnen Zweigen das entsprechende Taxon (Ordnung und/oder Gattung) angegeben. **B:** Phylogenie und Taxonomie der *Glomeromycota* (AM-Pilze) und *Geosiphon. pyriformis* (A verändert aus: Schüßler et al., 2001; B aus Schüßler 2005).

Die strukturellen Ähnlichkeiten der symbiotischen Kontaktflächen zwischen der AM- und der *Geosiphon*-Symbiose sowie die auf molekularer Ebene bestätigte taxonomische Zugehörigkeit von *Geosiphon pyriformis* zu den AM-Pilzen führten zu der Ansicht, dass *Geosiphon* als Modell-Symbiose für die AM dienen kann (Schüßler und Kluge, 2001). *Geosiphon* bietet für Untersuchungen im Vergleich zur AM bei Pflanzen zwei wesentliche Vorteile. Erstens kann *Geosiphon* unter Laborbedingungen leicht kultiviert und beobachtet werden (Schüßler und Wolf, 2005). Zweitens ist hier nur der Pilzpartner eukaryotisch, nicht aber der Photobiont wie bei der wirklichen AM. Pilzliche und bakterielle mRNA können bei *Geosiphon* über das der eukaryotischen mRNA eigene polyA-Ende leicht voneinander getrennt werden, ein Umstand, der auch in dieser Arbeit zum Tragen kam. Die aus der polyA-RNA synthetisierte cDNA kann anschließend für molekulare Untersuchungen

verwendet werden. Somit bietet die *Geosiphon*-Symbiose die Möglichkeit, Schlüsselfunktionen für das Verständnis der AM-Symbiose mit molekularen Methoden zu untersuchen, die bei anderen AM-Pilzen nur schwer anwendbar sind

1.3 Zuckertransport über Biomembranen

Wie später dargestellt werden wird, mündete ein Teil der Untersuchungen in dieser Dissertation in der molekularen und funktionellen Charakterisierung eines Zuckertransporters. Daher sollen bereits an dieser Stelle einige allgemeine Anmerkungen über Zuckertransporter, besonders im Zusammenhang mit Pilzen und der Mykorrhiza gemacht werden.

Der Transport von Zuckern über Zellmembranen ist einer der wichtigsten biologischen Prozesse und erfolgt mittels einer Reihe von Kanälen und Transportproteinen. Eine große Gruppe von Transportern wird aufgrund struktureller und funktioneller Ähnlichkeiten zu der so genannten „major facilitator superfamily“ (MFS) zusammengefasst (Marger und Saier, 1993). Die Mitglieder der MFS-Familie bestehen aus einem Polypeptid (meist mit einer Länge von 400-600 Aminosäuren) und funktionieren als Symporter, Uniporter, und Antiporter. Von Membrankanälen unterscheiden sie sich dadurch, dass sie keine durchgehende Verbindung zwischen beiden Seiten einer Membran herstellen. Die Gruppe der MFS umfasst inzwischen mehr als 1000 identifizierte Proteine (Huang et al., 2003), die von einer relativ alten Genfamilie kodiert werden, deren Mitglieder in Bakterien, Archaeobakterien, Tieren, Pflanzen, und Pilzen vorkommen. Dass die Zuckertransporter von Bakterien und Säugetieren eng miteinander verwandt sind, wurde bereits 1987 von Maiden et al. berichtet. Die Aminosäuresequenzen der MFS sind relativ hoch konserviert was die Zuordnung neu identifizierter Gene erleichtert. Die Monosaccharidtransporter (MST) stellen dabei eine Untergruppe der MFS dar. Die in Pflanzen identifizierten MST transportieren z.B. D-Glukose, D-Mannose, D-Fruktose, D-Galaktose, und D-Xylose (Büttner und Sauer, 2000). Auch die pilzlichen MST besitzen ein ähnliches Substratspektrum, so transportiert HXT1 aus *Uromyces fabae* die Hexosen D-Glukose, D-Mannose, D-Fruktose, und D-Galaktose (Voegelé et al., 2001). Aber auch Hexosederivate wie z.B. Glukosamin können von MST transportiert werden. Dabei scheint bei der Substraterkennung die C-4 Position des Zuckers oder Zuckerderivates eine wesentliche Rolle zu spielen. So wird z. B. das C-4-Glukose Stereoisomer Galaktose von AmMst1 aus *Amanita muscaria* weitaus schlechter als Glukose selbst transportiert (Nehls et al., 1998). Der erste eukaryotische Protonen-Symporter aus der MST-Familie wurde 1989 aus *Chlorella kessleri* isoliert (Sauer und Tanner, 1989). In Pilzen und Pflanzen wurden seither viele weitere MST identifiziert. So wurden in *Saccharomyces cerevisiae* 20 MST-Gene (Boles und Hollenberg, 1997; Lalonde et al., 1999). In *Arabidopsis thaliana* wurden bislang 66 putative MST identifiziert (Lalonde et al., 2004). Ein gut untersuchter MST aus einem Ektomykorrhizapilz ist der bereits erwähnte AmMst1 aus

Amanita muscaria (Nehls et al., 1998; Wiese et al., 2000). Aus AM-Pilzen konnte bislang noch keiner der beim Kohlenstoffaustausch im Arbuskel vermuteten Hexosetransporter isoliert werden. Die einzelnen Mitglieder der MFS unterscheiden sich vor allem durch Transportmechanismus und Substrataffinität. Einer der Transportmechanismen ist die erleichterte Diffusion. Bei dieser wird das Substrat passiv entlang eines Gradienten über die Membran transportiert. Dieses Funktionsprinzip findet sich z.B. bei den MFS-Hexosetransportern von *Saccharomyces cerevisiae* (Lalonde et al., 2004). Ein weiterer Mechanismus ist der sekundär aktive Transport. Bei diesem wird das Substrat, auch gegen seinen Gradienten, im Symport mit Protonen, über die Membran transportiert. Dazu wird von primär aktiven Systemen (z.B. H^+ -ATPasen) ein Protonengradient über die Membran aufgebaut. Der Symport des Substrats mit Protonen ist eine Eigenschaft der meisten pflanzlichen MST (Tanner und Caspari, 1996; Lalonde et al., 2004). Die K_M -Werte der MST umfassen Bereiche von z.B. 25 μ M D-Glukose bei MSTA aus *Aspergillus niger* (van Kuyk et al., 2004) und bis zu 100 mM D-Glukose bei den verschiedenen Hexosetransportern aus *Saccharomyces cerevisiae* (Reifenberger et al., 1997). Charakteristisch für die Aminosäuresequenz eines typischen MFS-Transporters sind insgesamt 11-12 Abschnitte, welche zum größten Teil aus hydrophoben Aminosäuren bestehen. Diese hydrophoben Bereiche sind *in vivo* in der Zellmembran lokalisiert und werden, aufgrund ihrer α -helikalen Sekundärstruktur, als Transmembran-Helices (TMH) bezeichnet. Die Verbindung der TMH untereinander erfolgt durch Sequenzabschnitte mit zumeist hydrophilen Aminosäuren. Diese hydrophilen Bereiche sind abwechselnd im extra- oder intrazellulären Bereich lokalisiert (siehe Abb. 7A und 7B). Der Transportvorgang für die erleichterte Diffusion von Substraten über einen MST lässt sich anhand eines vereinfachten Modells darstellen (siehe Abb. 7C). Dabei kann das Transportprotein zwischen zwei Konformationen wechseln, die Substratbindestelle ist dann entweder dem extra- oder dem intrazellulären Bereich zugewandt. Nachdem extrazellulär ein Substratmolekül gebunden hat, wird es durch eine Konformationsänderung des MST über die Membran in das Zytoplasma transportiert. Nachdem die Bindung zwischen Substrat und Transporter wieder gelöst ist, reorientiert der MST seine Substratbindestelle wieder in den extrazellulären Bereich und ist somit bereit zur Bindung eines neuen Zuckermoleküls. Dabei stehen die einzelnen Reaktionen eines solchen Transportzyklus über Konstanten miteinander im Gleichgewicht (siehe Abb. 7C). Der Substrattransport über einen MST im Symport mit Protonen als Kosubstrat erfolgt ähnlich, aber zumeist nach dem so genannten „sequentiellen Mechanismus“ (Boorer et al., 1994, Büttner und Sauer, 2000). Dabei bindet extrazellulär zunächst das Kosubstrat und wird mittels Konformationsänderung des MST über die Membran transportiert. Danach reorientiert der nun energetisierte MST seine Substratbindestelle wieder in den extrazellulären Bereich. Anschließend wiederholt sich der Transportzyklus mit dem Substrat. Dieser sequentielle

Mechanismus steht im Gegensatz zum Transportmechanismus einiger Na^+ -Symporter, welche allerdings nicht zur MFS gehören. Bei diesen erfolgt der Transport von Substrat und Kosubstrat über die Membran in einem Schritt.

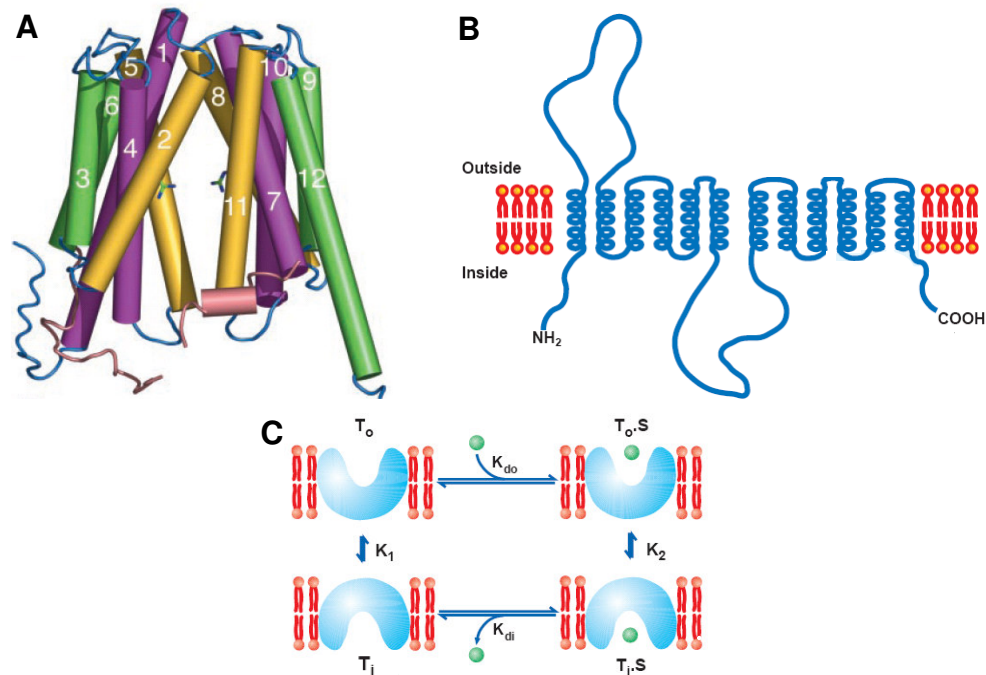


Abb. 7: **A:** Allgemeines Modell der Anordnung der Transmembran-Helices bei Mitgliedern der „major facilitator superfamily“ (MFS). **B:** Schematische Darstellung eines MFS-Transporters mit den angenommenen extra- und intrazellulären Substratbindestellen. **C:** Schematische Darstellung des Modells für den Mechanismus der erleichterten Diffusion über einen MFS-Transporter. Die Abkürzungen bedeuten: T₀: Konformation des unbeladenen Transporters mit Substratbindestelle auf der extrazellulären Membranseite; T₀:S: Konformation des beladenen Transporters mit Substratbindestelle auf der extrazellulären Membranseite; T_i:S: Konformation des unbeladenen Transportes mit Substratbindestelle auf der intrazellulären Membranseite; T_i: Konformation des unbeladenen Transportes mit Substratbindestelle auf der intrazellulären Membranseite. K₁, K₂, K_{do}, und K_{di} sind die Gleichgewichtskonstanten für die einzelnen Reaktionen. (A verändert aus: Huang et al., 2003; B und C verändert aus: Walmsley et al., 1998)

1.4 Ziele der Arbeit

Zwischen den Symbionten in der *Geosiphon*-Symbiose erfolgt, wie auch in der arbuskulären Mykorrhiza (AM), ein bidirektionaler Stoffaustausch, dessen Mechanismen noch weitgehend unverstanden sind. Dies gilt insbesondere für den Kohlenstofftransport. So würde z.B. die Aufklärung von Lokalisation, Substratspektrum, und Transportmechanismus eines pilzlichen Zuckertransporters erheblich zum Verständnis beider Symbiosen beitragen. Im Rahmen dieser Dissertation sollte der Nährstoffaustausch in der *Geosiphon*-Symbiose auf molekularer Ebene untersucht werden. Interessant ist dies vor allem, da hier erzielte Resultate die Untersuchung der entsprechenden Mechanismen in der AM erheblich erleichtern würden. Da die *Geosiphon*-Symbiose bisher auf molekularer Ebene weitgehend unerforscht war, war das vorrangigste Ziel zunächst einmal eine cDNA bzw. cDNA-Banken aus *Geosiphon pyriformis* herzustellen. Nach Gelingen dieses Schrittes sollte der nächste gewagt werden, nämlich die strukturelle und funktionelle Charakterisierung von symbiosespezifisch exprimierten *Geosiphon*-Genen. Als Einstieg war dabei zunächst auch an Gene für den Phosphattransport gedacht worden. Da in der AM der Mechanismus des Phosphattransportes mittlerweile etwas besser als der des Kohlenstofftransports untersucht ist, wurde in dieser Arbeit der Schwerpunkt auf die Charakterisierung von Genen für den Zuckertransport gelegt.

Etablierung von Methoden zur mRNA-Isolation und zum Aufbau pilzlicher cDNA-Banken

Zu Beginn dieser Arbeit konnte auf keine Vorarbeiten bezüglich der Isolation und Handhabung von mRNA aus *Geosiphon pyriformis* aufgebaut werden. Zunächst musste daher eine verlässliche Methode zur Isolation von mRNA aus relativ geringen Mengen an *Geosiphon*-Blasen entwickelt werden. Anschließend sollte ein geeignetes Verfahren zur cDNA-Synthese etabliert werden. Die erhaltene cDNA sollte dann durch Klonierung und Sequenzierung auf ihre Qualität untersucht werden, um anschließend subtraktive- und Vollängen-cDNA-Banken aufzubauen.

Charakterisierung symbiosespezifischer Gene und deren Produkte aus *Geosiphon pyriformis*

Zwischen den Symbionten in der *Geosiphon*-Symbiose muss ein reger Stoffaustausch erfolgen. Gene, deren Produkte direkt an diesen Transportprozessen beteiligt sind („Schlüsselgene“), werden als symbiosespezifisch betrachtet. Durch differentielles Screening und funktionelle Hefekomplementation sollte die subtraktive- bzw. Vollängen-cDNA-Bank nach solchen Genen durchsucht werden. Von besonderem Interesse waren Gene, die im Zusammenhang mit der Aufnahme und Metabolismus von Zucker durch *Geosiphon pyriformis* stehen. Die gefundenen Gene sollten dann auf physiologischer und molekularer

Ebene charakterisiert werden. Schließlich sollte versucht werden, wenn möglich, auch die korrespondierenden Gene aus einem weiteren AM-Pilz zu isolieren.

2. Material und Methoden

Verwendete Abkürzungen

Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumine
cDNA	Copy-DNA
cRNA	Copy-RNA
dsDNA	Double-stranded DNA
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
KPP	Kaliumphosphatpuffer
MES	Morpholinethansulfonsäure
MOPS	3-Morpholino-1-propansulfonsäure
MCS	multi cloning site
OD _x	Optische Dichte bei x (nm)
ORF	Open reading frame
PCR	Polymerase chain reaction
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
ssDNA	Single-stranded DNA
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TAE	Trisacetat-EDTA
TMH	Transmembran-Helix
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
UTR	Untranslated region
WDS	Working dye solution

2.1 Geräte

Autoklav: TypC, Webeco, Bad Schwartau

Binokular: MZ 95, Leica, Wetzlar

Fluorometer für DNA Konzentrationsmessung: Hoefer DyNA Quant 200, Amersham, Freiburg

Fluoreszenzspektrometer: LS50, Perkin Elmer, Boston, U.S.A

Heiz-, und Kühlblock: Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg

Geldokumentation: Eigenbau, Digitalkamera Camedia C-2000 Z, Olympus, Hamburg und UV-Leuchttisch TFX-35 LM, Peqlab, Erlangen

Kombiniertes OD₆₀₀-Messgerät-Thermoschüttler:

Spectra Fluor Plus, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim

Kugelmühle: MM2000, Retsch, Haan

Kühlzentrifugen: Biofuge fresco, Heraeus, Hanau; 5804R, Eppendorf, Hamburg

Mikrowelle: FM411, Moulinex, Deutschland

Mikrodispensor zur Oocyteninjektion: Typ 3-000-203-XV, Drummond Scientific, Broomall, U.S.A

Mikropipetten und Mikroelektrodenziehgerät: Model PP-830, Narishige, Tokyo ,Japan

PCR Cycler: Mastercycler Gradient, Eppendorf, Hamburg

Photometer zur OD₆₀₀ Messung: Typ CO 8000, Cell Density Meter, WPA Biowave, Cambridge, UK

Phosphorimager: FLA 3000, Fuji Europe, Düsseldorf

pH-Meter: Seven Easy, Mettler Toledo GmbH, Urdorf, Schweiz

Quarzküvetten (für Hoefer DyNA Quant 200): Hoefer No. DQ 105, Amersham, Freiburg

Szintillationszähler:

Packard TriCarb Liquid Scintillation Analyzer 1600 CA, GMI, Ramsey, U.S.A

Saugpumpe: WISA300, WISA, Telgte

Sterilbank: Ehret 100/H/UV, Dipl. Ing. W. Ehret, Emmendingen

Tischzentrifugen: Biofuge pico, Heraeus, Hanau

UV Spektrometer: Typ S2100 Diode Array Spectrophotometer, WPA Biowave, Cambridge, UK

Vortexer: Reax 2000, Heidolph, Schwabach

Verstärker für elektrophysiologische Messungen: Turbo-TEC-03X, Two Electrode Clamp System, NPI Electronic, Göttingen

Wärme-und Schüttelschrank: Environmental Shaker ES20, Peqlab, Erlangen

Wärmeschrank: TV401, Desaga, Heidelberg

Wasserbäder: Frigostat, Desaga, Heidelberg; GFL1013, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel

2.2 Software

Sofern nicht anders angegeben, wurden zur allgemeinen Daten- und Bildverarbeitung die PC-Programme Excel und Word (Microsoft) sowie Paint Shop Pro7 (Jasc Software, Eden Prairie, U.S.A) verwendet.

2.3 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien und Lösungsmittel der Firmen AppliChem (Darmstadt), Boehringer (Mannheim), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) in der Qualitätsstufe „pro analysis“ verwendet.

Bei H₂O bidest handelt es sich um deionisiertes Wasser mit einer Leitfähigkeit von 0,2-0,055 µS/cm, das mit einem Seralpur 90 CN-Reinstwassersystem (Seralpur, Ransbach) hergestellt wurde. Für H₂O 4-dest wurde H₂O bidest in einer Heraeus-Destillationsanlage (Heraeus, Hanau) nochmals zweistufig destilliert.

2.4 Enzyme

SAWADY Taq-Polymerase, Peqlab, Erlangen

Eco R I, MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Xho I, MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Sfi I, New England Biolabs, Frankfurt/Main

Mlu I, New England Biolabs, Frankfurt/Main

Rsa I, New England Biolabs, Frankfurt/Main

T4 DNA Ligase, New England Biolabs, Frankfurt/Main

Phusion High Fidelity DNA-Polymerase, BioCat, Heidelberg

Advantage 2 PCR Enzyme System, BD Biosciences Clontech, Heidelberg

Weitere verwendete Enzyme waren in den in dieser Arbeit verwendeten Kits enthalten; siehe Punkt 2.10.

2.5 Medien

Um Medien zu sterilisieren wurden diese autoklaviert. Dies erfolgte durch 15-20 minütige Inkubation (je nach Volumen) im Wasserdampf bei 1,5 bar und 121 °C.

BG11

NaNO ₃	(15 g/100 ml)	10 ml
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	(0,4 g/100 ml)	10 ml
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	(0,75 g/100 ml)	10 ml
Zitronensäure	(0,06 g/100 ml)	10 ml
Fe(III)-NH ₄ -EDTA	(0,07 g/100 ml)	10 ml
Na ₂ CO ₃	(0,2 g/100 ml)	10 ml
CaCl ₂ x 2H ₂ O	(0,36 g/100 ml)	10 ml
BG11-Spurenelementlösung		1 ml

pH mit HCL auf 7,1 einstellen, mit H₂O bidest auf 1000 ml auffüllen und 20 min autoklavieren.

GM33-P (1000 ml)

MgSO ₄ x 7 H ₂ O	(0,5 M)	200 µl
Ca(NO ₃) ₂	(1 M)	200 µl
KCl	(1 M)	100 µl
MES	(1 M)	1000 µl
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	(10 mM)	500 µl
K ₂ SO ₄	(0,25 M)	400 µl
KBr	(0,1 mM)	10 µl
Spurenelementlösung WC I		10 µl
Spurenelementlösung WC II		10 µl
H ₂ O bidest		ad 900 ml

pH mit KOH auf 6,0 einstellen, mit H₂O bidest auf 1000 ml auffüllen und 20 min autoklavieren.

LB-Ampicillin Flüssigmedium (1000 ml)

Na Cl	10 g
Bacto-Trypton (Casein-Hydrolysat)	10 g
Hefeextrakt	5 g
H ₂ O bidest	ad 900 ml

pH mit NaOH auf 7,4 einstellen, mit H₂O bidest auf 1000 ml auffüllen und 20 min autoklavieren. Auf ca. 55° C abkühlen lassen und 1 ml einer sterilfiltrierten Ampicillin-Stocklösung (50 µg/µl in H₂O bidest) zugeben.

LB-Ampicillin Agar (1000 ml)

32 g LB-Agar-Fertigmischung (FLUKA, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) mit H₂O bidest auf 900 ml auffüllen, pH mit NaOH auf 7,4 einstellen, mit H₂O bidest auf 1000 ml auffüllen und 20 min autoklavieren. Auf ca. 55° C abkühlen lassen und 1 ml einer sterilfiltrierten Ampicillin-Stocklösung (50 µg/µl, in H₂O bidest) zugeben.

ND 96 (1000 ml)

NaCl	5,6 g
KCl	0,15 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,26 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,2 g
HEPES	1,3 g
H ₂ O	ad 900 ml

pH mit NaOH auf 7,5 einstellen und 20 min autoklavieren. Auf RT abkühlen lassen, dann Antibiotika zu folgender Endkonzentration zusetzen: Penicillin: 10 µg/ml, Streptomycin: 10 µg/ml. Abschließend mit sterilem H₂O bidest auf 1000 ml auffüllen.

NZY⁺ Broth (1000 ml)

NZ Amine (Kasein Hydrolysat)	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
H ₂ O	ad 900 ml

pH mit NaOH auf 7,5 einstellen und 20 min autoklavieren. Danach folgende, sterilfiltrierte Lösungen zugeben:

MgCl ₂ (1 M)	12,5 ml
MgSO ₄ (1 M)	12,5 ml
Glukose (2 M)	10 ml

Abschließend mit sterilem H₂O auf 1000 ml auffüllen.

SD-Agar mit 22 mM Glukose (1000 ml)

Yeast nitrogen base w/o amino acids (Difco)	6.7 g
Agarose (Roth)	20 g
H ₂ O	ad 850 ml

Für 15 min autoklavieren, nach dem Abkühlen auf ca. 55°C 20 ml einer autoklavierten 20 %igen Glukose-Stocklösung und anschließend die folgenden, sterilfiltrierten Aminosäuren zugeben:

Tryptophan (2 mg/ml)	25 ml
Leucin (20 mg/ml)	2 ml
Histidin (20 mg/ml)	1 ml

Abschließend mit sterilem H₂O bidest auf 1000 ml auffüllen.

SD-Flüssigmedium mit 22 mM Glukose (1000 ml)

Wie SD-Agar mit 22 mM Glukose, aber ohne Agarose

SD-Agar mit 2% Maltose (1000 ml)

Wie SD-Agar mit 22 mM Glukose, nach dem autoklavieren statt Glukose 100 ml einer autoklavierten 20 % Maltose-Stocklösung zugeben.

YPM-Agar (1000ml)

Yeast extract (Roth)	10 g
Trypton/Pepton (Roth)	20 g
Agarose (Roth)	15 g
H ₂ O bidest	ad 900 ml

Für 20 min autoklavieren danach 100 ml einer autoklavierten 20 %igen Maltose-Stocklösung zugeben, abschließend mit sterilem H₂O bidest auf 1000 ml auffüllen.

YPM-Flüssigmedium (1000ml)

Wie YPM-Agar, aber ohne Agarose.

2.6 Puffer

DNA-Gelauftragspuffer

6 x Loading dye solution, MBI Fermentas:

0,09 % Bromphenolblau, 0,09 % Xylencyanol FF, 60 % Glycerin, und 60 mM Na₂EDTA

KPP Puffer Es wurden je 100 mM Lösungen von KH₂PO₄ und K₂HPO₄ angesetzt und etwa zu gleichen Teilen gemischt. Daraus resultiert eine Lösung mit einem pH-Wert von 6,5.

MEA-Puffer (10 x, 500 ml)

MOPS	20,93 g
Natriumacetat	2,05 g
Na ₂ EDTA	1,86 g
H ₂ O	ad 500 ml

RNA-Gelauftragspuffer

2 x RNA ladder sample buffer, New England Biolabs, Frankfurt/Main

2 x TBE (pH8,3), 13 % Ficoll (w/v), 0,01 % Bromphenolblau und 7M Harnstoff

RNA Laufpuffer (1 x, 250 ml)

MEA-Puffer (10 x)	25 ml
Formaldehyd (37 %)	5 ml
H ₂ O	<u>220 ml</u>
	250 ml

TAE-Laufpuffer (50 x, 1000 ml)

Tris-HCl	242 g
Essigsäure (100 %)	57,1 ml
Na ₂ EDTA	9,3 g

In 800 ml H₂O bidest lösen, pH 8,0 mit Essigsäure einstellen, mit H₂O bidest auf 1000 ml auffüllen.

TE-Puffer pH 7,6 (20 x, für Fluoreszenzfarbstoff Ribo Green)

Molecular Probes, Poort Gebouw, Niederlande

TE-Puffer (10 mM, pH 8,0)

Tris-HCl (0,5M, pH 8,0)	1ml
Na ₂ EDTA (1M, pH 11,25)	0,2ml

In 80 ml H₂O bidest lösen, pH 8,0 mit HCl einstellen, mit H₂O bidest auf 100 ml auffüllen, 15 min autoklavieren.

TNE-Puffer (10 x) für Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 (100 ml)

In einer 100 ml Blaukappflasche 68 ml H₂O bidest 15 min autoklavieren, danach folgende, sterilfiltrierte Stocklösungen zugegeben:

NaCl (5 M)	20 ml
Tris-HCl (1 M, pH 7,4)	10 ml
Na ₂ EDTA (0,5 M, pH 8,0)	2 ml

Transportpuffer pH 5 (1000 ml)

CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,29 g
Cholinchlorid	7,8 g
Sorbitol	18,22 g
MES	1,95 g
H ₂ O	ad 900ml

pH mit Tris-Base (1M) auf 5,0 einstellen abschließend mit H₂O bidest auf 1000 ml auffüllen.

Transportpuffer pH 5 mit 50 mM Glukose (1000 ml)

CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,29 g
Cholinchlorid	7,8 g
Sorbitol	9,1g
D-Glukose	9 g
MES	1,95 g
H ₂ O	ad 900ml

pH mit Tris-Base (1M) auf 7,5 einstellen abschließend mit H₂O bidest auf 1000 ml auffüllen.

Transportpuffer pH 7,5

CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,29 g
Cholinchlorid	7,8 g
Sorbitol	18,22 g
Tris-Base	1,21 g
H ₂ O bidest	ad 900ml

pH mit MES (1M) auf 5,0 einstellen abschließend mit H₂O bidest auf 1000 ml auffüllen.

2.7 Lösungen

Carrier-DNA (2 mg/ml)

200 mg DNA (Deoxyribonucleic acid sodium salt Type III, from Salmon testes, Sigma D1626, Sigma, Taufkirchen) werden in 100 ml TE-Puffer (10 mM, pH 8,0) in einem 150 ml Becherglas gelöst. Auf dem Magnetrührer rühren lassen, bis die DNA vollständig gelöst ist.

Dies dauert etwa zwei Stunden. Die Lösung anschließend in 15 ml-Falconröhrchen zu je 10 ml aliquotieren und bei -20° C lagern. Kurz vor der Transfektion wird die benötigte Menge an Carrier-DNA denaturiert. Dazu die DNA im Wasserbad für fünf Minuten kochen und sofort auf Eis stellen. Die DNA-Lösung ist durch das Kochen ausreichend steril.

DEPC behandeltes H₂O

Um H₂O RNase-frei zu machen, wurde es mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) wie folgt behandelt: 1 ml DEPC wurde mit 1000 ml H₂O bidest in einer 1000 ml Blaukappflasche gemischt, im Wärmeschrank bei 37° C über Nacht inkubiert und anschließend zweimal autoklaviert um das DEPC vollständig zu zerstören (DEPC zerfällt bei Temperaturen über 100° C zu Kohlendioxid und Ethanol).

Hefe-Minilösung (100 ml)

Triton X-100 (10 %)	20 ml
SDS (20 %)	5 ml
NaCl (5M)	2 ml
Tris-HCl (1M, pH 8,0)	1 ml
Na ₂ EDTA (0,5 M)	200 µl
H ₂ O bidest	ad 100 ml

Anschließend für 15 min autoklavieren.

PEG 50 %

50 g PEG (Polyethylenglycol, MW 3350, Sigma P3640) mit 35 ml H₂O bidest versetzen und in einem 150 ml Becherglas auf einem Magnetrührer rühren lassen. Bis zum vollständigen Auflösen der Substanz vergeht etwa eine halbe Stunde, die resultierende Lösung sollte glasklar sein. Dann die Lösung in einen 100ml Standzylinder dekantieren und das Becherglas mit etwa 10ml H₂O bidest nachspülen. Die Spüllösung wird zur PEG Lösung im Standzylinder gefüllt. Danach das Volumen der Lösung mit H₂O bidest auf 100 ml bringen, mischen und die Lösung in eine 100 ml Blaukappflasche füllen. Abschließend die Lösung 15 min autoklavieren.

Ribo Green (DMSO Stock Solution)

Molecular Probes, Poort Gebouw, Niederlande

RNAse Inhibitor

Peqlab, Erlangen

Standardlösungen für die DNA-Konzentrationsmessung mit Hoechst 33258

Calf thymus DNA (Sigma, Taufkirchen, c= 1 µg/µl)

Davon Verdünnungen (in 1xTNE Puffer):

Standardlösung-100: c= 100 ng/µl

Standardlösung-10: c= 10 ng/µl

Spurenelementlösung für BG11-Medium:

$\text{H}_3\text{BO}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	2,86 g
$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$	1,81 g
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,222 g
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	0,079 g
$\text{NaMoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,39 g
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,049
H_2O bidest	ad 1000 ml

Anschließend für 15 min autoklavieren.

Spurenelementlösung WC I:

$\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	315,00 mg
$\text{Na}_2\text{EDTA} \times 1 \text{ H}_2\text{O}$	436,00 mg
Thiamin-HCl	10,00 mg
Biotin (Vit. H)	0,05 mg
Cyanocobalamin (Vit. B12)	0,05 mg

Mit H_2O bidest auf 100 ml auffüllen und autoklavieren.

Spurenelementlösung WC II:

$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	2,20 mg
$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$	18,00 mg
H_3BO_3	100,00 mg
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	1,00 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	1,99 mg
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	0,245 mg
NaHSeO_3	0,152 mg
$\text{NiCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,244 mg
Na_3VO_4	0,184 mg
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	0,147 mg

Mit H_2O bidest auf 100ml auffüllen und autoklavieren.

Working dye solution (WDS):

Hoechst 33258 (Molecular Probes, Poort Gebouw, Niederlande, c = 1 mg/ml)	5 µl
10x TNE Puffer (1 M NaCl, 10mM Na_2EDTA , 100 mM Tris-HCl, pH 7,4)	5 ml
H_2O 4-dest, sterilfiltriert	<u>45 ml</u>
	50 ml

2.8 Nukleinsäure-Marker

DNA Marker

50 bp Leiter, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, (c= 500 ng/μl)

100 bp Leiter, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, (c= 500 ng/μl)

1 kb Leiter, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, (c= 500 ng/μl)

RNA Marker

RNA Ladder, New England Biolabs, Frankfurt/Main

2.9 Zur Klonierung verwendete Bakterien- und Hefestämme

XL10 Gold (XL-1Blue MRF', Stratagene, La Jolla, U.S.A)

Genotyp: Tet^R Δ(*mcrA*)183 Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* [F'*proAB lacI*^fΔ*M15* Tn10 (C)Amy Cam^r]

TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe)

Genotyp: F⁻ *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80/*lacZ*Δ*M15* Δ*lacX74 recA1 deoR araD139* Δ(*ara-leu*)7897 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*

OMNI MAX (Invitrogen, Karlsruhe)

Genotyp: *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS- mcrBC*) Φ80(*lacZ*) Δ*M15* Δ(*lacZYA-argF*)U169 *endA1 recA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 deoR tonA panD/ F'proAB⁺ lacI^f lacZ*Δ*M15* Tn10(Tet^R)

EBY VW4000 (Eckhard Boles, Universität Frankfurt am Main, siehe Wieczorke et al., 1999):

Genotyp: *MATa Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δmph2 Δmph3 Δstl1 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2*

2.10 Verwendete Kits

polyA-RNA-Isolation

Dynabeads mRNA DIRECT Kit, DYNAL, Hamburg

cDNA-Synthese

SMART PCR cDNA Synthesis Kit, BD Biosciences Clontech, Heidelberg

Subtraktive Hybridisierung

CLONTECH PCR Select cDNA Subtraction Kit, BD Biosciences Clontech, Heidelberg

Differentielles Screening

PCR Select Differential Screening Kit, BD Biosciences Clontech, Heidelberg

DNA-Amplifikation

Advantage 2 PCR Enzyme System, BD Biosciences Clontech, Heidelberg

DNA-Aufreinigung

QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden

QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden

Microcon Microconcentrators, Amicon, Beverly, USA

cDNA-Bank Herstellung

Creator SMART cDNA Library Construction Kit, BD Biosciences Clontech, Heidelberg

cRNA-Herstellung

mMEssAGE mMACHINE High Yield Capped RNA Transcription Kit (SP6), Ambion, Huntingdon, UK

Plasmidpräparation

QIAprep Miniprep, Qiagen, Hilden

QIAGEN Plasmid Midi Kit, Qiagen, Hilden

Klonierung von PCR-Produkten

TOPO TA Cloning Kits for Sequencing, Invitrogen, Karlsruhe

Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR)

Sensiscript Reverse Transcriptase, Qiagen, Hilden

2.11 Methoden

2.11.1. Kultivierung von *Geosiphon pyriformis*

Geosiphon pyriformis wurde auf einem Gemisch aus Erde vom natürlichen Standort (Biebergemünd, Gemeinde Bieber, Spessart) und Aktivkohle kultiviert (Schüßler und Wolf 2005). Dazu wurde vom Standort abgegrabene Erde (ca. 2-3 cm der obersten Schicht) trocken durch ein Sieb mit 2 mm Maschenweite gerieben, dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen, getrocknet, erneut gesiebt und mit ca. 1-2 g /kg Aktivkohle gemischt. Das Gemisch wurde in einen Polypropylen-Blumentopf (Ø 7,5 cm; Höhe 7 cm) bis ca. 1 cm unter den Rand gefüllt. Das Bodenloch des Topfes wurde zuvor mit grobkörnigem Aquariensand bedeckt und mit feinkörnigem Quarzsand (Sigma, Deisenhofen) bis auf Höhe der Bodenwölbung überschichtet. Der Topf wurde anschließend in ein 400 ml Becherglas (Ø 7,5 cm; Höhe 12,5 cm) gestellt. Dieses wurde ca. 3 cm hoch mit H₂O 4-dist gefüllt. Zur Wasserversorgung wurde eine ca. 8 cm lange Rolle aus Filterpapier in das Bodenloch gesteckt. Die so vorbereiteten Töpfe wurden mit Aluminiumfolie abgedeckt und im Abstand von 1-2 Tagen jeweils 20 min autoklaviert. Das mehrfache Autoklavieren dient dazu, um in der Erde vorhandene, hitzeresistente Pilzsporen keimen zu lassen und beim zweiten Autoklavieren abzutöten. Die abgekühlten Kulturbedälter wurden unter der Sterilbank beimpft, mit Kunststoff-Petrischalen (Ø 9 cm) abgedeckt und mit in 70 % Ethanol gereinigten Parafilmsteifen verschlossen. Die Beimpfung erfolgte entweder an drei Stellen auf der Bodenoberfläche durch Pakete von mehreren, mit Hyphen verbundenen Blasen aus einer Kultur von *Geosiphon pyriformis* oder durch gleichzeitige Beimpfung mit 10-20 Sporen von *Geosiphon pyriformis* und einem 1 mm großen Stück eines *Nostoc*-Thallus (Stamm 1:1-26, ursprünglich von D. Mollenhauer aus *Geosiphon* isoliert = SAG 69.79 = PCC 9503; der

verwendete *Nostoc*-Stamm wurde in Petrischalen auf mit Zellophan abgedecktem, mit 2 % Agar verfestigtem BG11-Medium bei 18° C kultiviert). Die beimpften Kulturen wurden in einem Klimaraum in einem Tag/Nacht-Rhythmus von 14 h Licht (PPFD 90-120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) auf Kulturebene und 10 h Dunkel bei 18° C inkubiert. Nach 6-8 Wochen zeigten sich in der Regel neu gebildete Blasen von *Geosiphon pyriformis*. Bis zu einer stabilen Kultur vergingen ca. 3 Monate.

2.11.2 polyA-RNA-Isolation aus *Geosiphon*

2.11.2.1 Präparation von *Geosiphon*-Blasen und Rohlysate-Herstellung

Zur Isolation von polyA-RNA wurden 500-700 *Geosiphon*-Blasen aus Erdkulturen (siehe 2.11.1.) präpariert. Dazu wurde ein Kulturgefäß unter der Sterilbank geöffnet. Die Blasen wurden mit einer sterilen Pinzette, samt der mit dem Myzel verbundenen oberen Erdschicht, in Stücken von ca. 1 cm Durchmesser abgenommen. Die Blasen wurden dann in eine Petrischale mit GM33-P-Medium überführt. Anschließend wurden die Blasen unter dem Binokular mit zwei spitzen Pinzetten (Dumont, Nr. 5) zu Gruppen von 10-20 Blasen vereinzelt, weitestgehend von anhaftender Erde, Pilzmyzel und Cyanobakterien befreit und in eine saubere Petrischale mit frischem Medium gebracht. Anschließend wurden die Blasen über Nacht bei 18° C gelagert. Am nächsten Tag wurden alle abgestorbenen Blasen entfernt. Die gereinigten Blasen wurden in ein 2 ml-Eppendorfgefäß überführt und das Medium entfernt. Anschließend wurden die Blasen durch Eintauchen des Gefäßes in flüssigen N₂ eingefroren. Zum Aufschließen der Blasen wurde eine Kugelmühle (MM2000, Retsch) verwendet. Dazu wurde zunächst eine durch Erhitzen sterilisierte Wolfram-Carbid-Kugel (Ø 5 mm) in einem 2 ml-Eppendorfgefäß in flüssigem N₂ tiefgekühlt und danach zu den eingefrorenen *Geosiphon*-Blasen zugegeben. Das Gefäß mit den Blasen wurde in eine mit N₂ gekühlte Teflon-Halterung für 2 ml-Eppendorfgefäße (Zubehör für MM2000) gesteckt und diese der Zelmühle fixiert. Anschließend wurden die Blasen mit 80 % Leistung für 2 min gemahlen und dann durch Zugabe von 300 μl Lysis-Binding-Buffer („Dynabeads mRNA DIRECT Kit“) bei RT aufgetaut. Diese Suspension wurde ca. 1 min mit einem Vortexer homogenisiert und für 1 min mit 11 000 g zentrifugiert. Das erhaltene Rohlysate wurde in ein frisches 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt und im nächsten Schritt zur polyA-RNA-Isolation eingesetzt.

2.11.2.2 polyA-RNA-Isolation aus dem Rohlysate

Die polyA-RNA-Isolation aus dem unter 2.11.2.1 erhaltenen Rohlysate erfolgte mit dem „Dynabeads mRNA DIRECT Kit“. Dynabeads sind ca. 2,8 μm große magnetische Partikel an die ein polyT-Nukleotid von 25 Basen Länge gekoppelt ist. Das Prinzip dieser Methode ist, die in einem Lysat vorhandene mRNA über ihr polyA-Ende an das polyT der Dynabeads zu binden. Durch Anlegen eines Magneten an das Reaktionsgefäß kann die gebundene polyA-

RNA leicht von den anderen Bestandteilen des Lysates getrennt und gereinigt werden. Eine schematische Darstellung des Versuchsablaufs ist Abb. 8 gezeigt. Zur polyA-RNA-Isolation wurden die Dynabeads zunächst resuspendiert, dann wurden 50 µl der Suspension in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt. Allen Waschschritten (Pufferwechsel) ging ein Anlegen des Magneten an das Eppendorfgefäß für 30 s voraus. Der Storage-Buffer wurde entfernt, die Dynabeads einmal mit 50 µl Lysis-Binding-Buffer gewaschen. Anschließend wurde das Pellet mit dem unter **2.8.2.1** erhaltenen Lysat resuspendiert. Danach wurde das Eppendorfgefäß für 5 min bei RT kontinuierlich von Hand gedreht, damit die Dynabeads in Suspension gehalten wurden. In dieser Zeit konnte die im Lysat befindliche polyA-RNA an die Beads binden. Anschließend wurde das Lysat entfernt, das Pellet zweimal mit je 600 µl Waschpuffer A gewaschen und danach in 300 µl Waschpuffer B resuspendiert. Die erhaltene Suspension wurde in ein frisches 0,5 ml-Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurde die polyA-RNA von den Dynabeads eluiert. Dazu wurde zunächst der Waschpuffer B entfernt. Dann wurde das Dynabeads-Pellet in 6 µl Tris-HCl (10 mM, im Kit enthalten) resuspendiert und die Suspension im PCR-Cycler für zwei Minuten auf 90° C erhitzt. Danach wurde das Eppendorfgefäß sofort in einen Magnethalter überführt und das Lysat mit der polyA-RNA in ein frisches 0,5 ml-Eppendorfgefäß überführt.

Rohlysat aus *Geosiphon*-Blasen

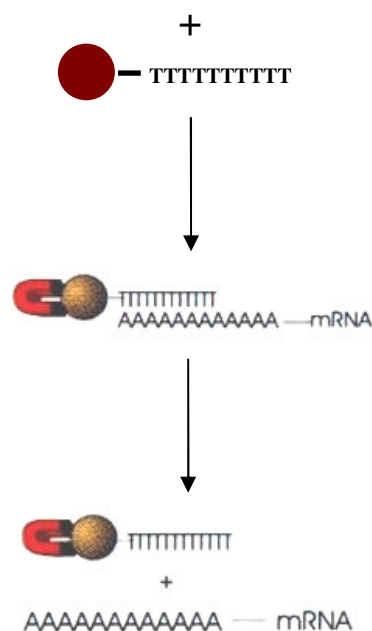


Abb. 8: Schematische Darstellung der mRNA Isolation mit Dynabeads Magnetpartikeln (verändert aus dem Protokoll für das „Dynabeads mRNA DIRECT Kit“, Version 2002).

2.11.2.3 Messung der in *Geosiphon*-Blasen enthaltenen Menge an polyA-RNA

2.11.2.3.1 Abschätzung durch Vergleich mit RNA-Mengen anderer Zellen

Für die dieser Arbeit zugrunde liegende cDNA-Herstellung aus polyA-RNA war es zunächst wichtig herauszufinden, wie viel polyA-RNA aus dem zur Verfügung stehenden Pilzmaterial

isoliert werden konnte. Durch Vergleich mit Literaturangaben bekannter polyA-RNA-Mengen verschiedener Gewebearten, wurde die polyA-RNA-Konzentration zunächst geschätzt. Die Vergleichswerte hierfür wurden dem Handbuch des „Dynabeads mRNA DIRECT Kits“ (Version 2002) entnommen, danach enthält:

Eine Säugierzelle:	ca. 0,1 pg polyA-RNA
50 mg: Muskelgewebe	ca. 0,5 µg polyA-RNA
50 mg: Lebergewebe	ca. 4,0 µg polyA-RNA

Zunächst wurden 500 *Geosiphon*-Blasen präpariert, gereinigt und in ein 2 ml-Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurde das Medium entfernt und das Gefäß gewogen. Vom ermittelten Gewicht wurde, um das Restmedium zwischen den Blasen zu berücksichtigen, die Hälfte abgezogen. Anhand des so ermittelten Frischgewichts wurde der polyA-RNA-Gehalt der Blasen unter Berücksichtigung des oben gegebenen Werts für Muskelgewebe geschätzt.

2.11.2.3.2 Messung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ribo Green

Eine Möglichkeit sehr geringe Mengen an RNA zu messen, bietet der Fluoreszenzfarbstoff „Ribo Green“, welcher an ssRNA bindet. In gebundener Form liegt das Maximum des Anregungsspektrums des Farbstoffs bei etwa 500 nm, das des Emissionsspektrums bei etwa 525 nm. Ungebundener Farbstoff kann praktisch nicht zur Fluoreszenz angeregt werden. Zur Messung wurde zunächst, wie unter 2.11.2 beschrieben, die polyA-RNA von 50 *Geosiphon*-Blasen isoliert. Aufgrund der geringeren Anzahl der Blasen wurden die Mengen der eingesetzten Materialien wie folgt verändert:

<u>Dynabeads-Suspension:</u>	20 µl
<u>Waschpuffer A:</u>	100 µl
<u>Waschpuffer B:</u>	100 µl

Nach dem letzten Waschschriff wurde die polyA-RNA von den Dynabeads eluiert. Dazu wurde zunächst der Waschpuffer B entfernt und das entstandene Pellet in 20 µl Tris-HCL (10 mM, im Kit enthalten) resuspendiert. Anschließend wurde das Eppendorfgefäß im PCR-Cycler für zwei Minuten auf 90° C erhitzt und danach sofort in einen Magnethalter gebracht. Das Eluat wurde dann in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die so erhaltene polyA-RNA wurde direkt zur Konzentrationsmessung eingesetzt. Für die Messung wurden folgende Lösungen angesetzt:

Ribo-Green-Farbstofflösung („Low Range Assay“, nach Herstellerprotokoll vom 15.1.2001)

Ribo Green DMSO Stock Solution	1 µl
TE-Puffer pH 7,6 (20 x)	<u>1999µl</u>
	2 ml

Standard-RNA (c = 1 ng/μl)

RNA (NEB RNA ladder, c= 500 ng/μl)	1 μl
H ₂ O (RNase frei, DEPC behandelt)	<u>499 μl</u>
	500 μl

Proben für Standardmessung:

1.) Standard-RNA (c=1 ng/μl)	2,5 μl (= 2,5 ng)
TE-Puffer pH 7,6 (20 x)	<u>247,7 μl</u>
	250 μl
2.) Standard-RNA (c=1 ng/μl)	5,0 μl (= 5 ng)
TE-Puffer pH 7,6 (20 x)	<u>245 μl</u>
	250 μl
3.) Standard-RNA (c=1 ng/μl)	10 μl (= 10 ng)
TE-Puffer pH 7,6 (20 x)	<u>240 μl</u>
	250 μl

Die Konzentrationsmessungen wurden mit einem Fluoreszenzspektrometer (LS 50, Perkin Elmer) durchgeführt. Dazu wurden die Proben jeweils in eine 500 μl-Quarzglasküvette überführt. Zunächst wurde die Standardmessung durchgeführt: Die Proben 1-3 wurden mit je 250 μl der Ribo-Green-Farbstofflösung gemischt und bei RT im Dunkeln für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben in die Küvette überführt, die Fluoreszenz wurde mit folgenden Einstellungen gemessen: Excitation 480 nm, Emission 520 nm, Slit width 10 nm, Integrate time 1 s. Abschließend wurde der Nullwert ermittelt: 250 μl TE-Puffer wurden mit 250 μl Farbstofflösung vermischt, dann wurde die Fluoreszenz der Probe gemessen. Von den Fluoreszenzwerten der drei Proben der Standardmessung wurde jeweils der ermittelte Nullwert abgezogen. Die erhaltenen Werte wurden in einem Diagramm gegen die entsprechende RNA-Menge aufgetragen. Über die Messpunkte wurde eine Regressionsgerade gelegt (siehe Abb. 9). Zur anschließenden Konzentrationsmessung der *Geosiphon*-polyA-RNA wurde folgender Ansatz vorbereitet:

<i>Geosiphon</i> -polyA-RNA	5 μl
TE-Puffer pH 7,6 (20 x)	<u>245 μl</u>
	250 μl

Der gesamte Ansatz wurde mit 250 μl Farbstofflösung gemischt und wie die Proben für die Standardgerade gemessen. Von den Fluoreszenzwerten wurde der Nullwert abgezogen, danach konnte, anhand der Standardgeraden, die in der Probe enthaltene polyA-RNA-Menge ermittelt werden.

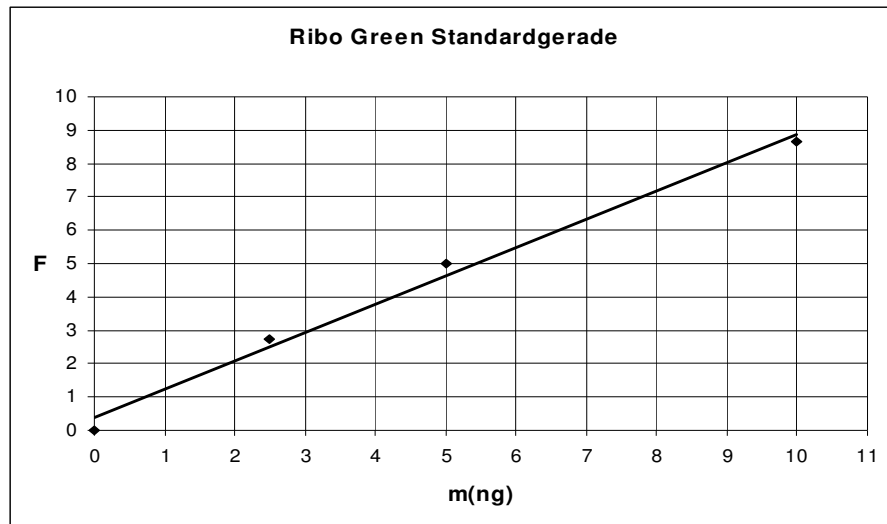


Abb. 9: Standardgerade für den Fluoreszenzfarbstoff Ribo Green. Auf der x-Achse sind die Werte der eingesetzten Mengen an Standard-RNA, auf der y-Achse die entsprechenden Fluoreszenzwerte aufgetragen.

2.11.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Mit der PCR können DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten Sequenzen flankiert sind, *in vitro* vervielfältigt werden. Diese Methode wurde von Mullis und Faloona 1987 (Mullis et al., 1986) entwickelt, und ist mittlerweile ein weit verbreitetes Verfahren. Bei der PCR wird der zu vermehrende Abschnitt einer DNA-Sequenz folgenden Reaktionsschritten unterworfen:

1.) Hitzenaturierung („Aufschmelzen“) der DNA in Einzelstränge bei ca. 94° C.

2.) Hybridisierung chemisch synthetisierter Oligonukleotide („Primer“) an ihre entsprechenden komplementären Sequenzen („Primerannealing“). Die Primersequenz leitet sich aus bekannten, die gesuchte Sequenz flankierenden DNA-Bereichen ab. Die entstehenden, kurzen, doppelsträngigen DNA-Sequenzen dienen als Ansatzstelle einer DNA-Polymerase. Die Hybridisierungstemperatur ist von der Primerstruktur und -länge abhängig und liegt zwischen 30° C und 70° C.

3.) Verlängerung („Elongation“) der Primer in 3´-Richtung durch die DNA-Polymerase unter Einbau von dNTP und Verwendung des DNA-Einzelstranges als Matrize für die Synthese. Die Temperatur hängt dabei vom Temperaturoptimum der verwendeten DNA-Polymerase ab. Für die meist verwendete hitzebeständige Taq-Polymerase aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* liegt die optimale Reaktionstemperatur bei 72° C.

Die drei Reaktionsschritte werden nun in n Zyklen wiederholt und man erhält bei optimalem Reaktionsverlauf, von einem DNA-Molekül ausgehend, theoretisch 2^n Kopien (was praktisch nicht erreicht wird). Der Ablauf der PCR Amplifikation gliedert sich im Wesentlichen in drei Abschnitte:

Die Dauer der Extension richtete sich nach der Länge des Templates, zur Orientierung diente die Synthesegeschwindigkeit der Taq-Polymerase von ≥ 1000 bp/min.

2.11.3.1 Geschachtelte PCR (Nested-PCR)

Bei dieser Form der PCR wird ein Aliquot eines PCR-Produkts in einer zweiten PCR erneut amplifiziert. Dazu wird ein Primerpaar verwendet, welches innerhalb der durch das erste Primerpaar amplifizierten DNA-Sequenz bindet. Durch diese Methode wird die Spezifität der DNA-Vervielfältigung erhöht, weil unspezifische Produkte aus der 1. PCR mit den Primern der Nested-PCR nicht amplifiziert werden. Zudem werden geringe Produktmengen des gewünschten Abschnitts aus der 1. PCR durch die Nested-PCR angereichert. Für die Amplifikation durch eine Nested-PCR wurden pro Ansatz ca. 10 ng Template-DNA verwendet.

2.11.3.2 Colony-PCR

Um zu prüfen, ob die Plasmide transformierter Klone das gewünschte Insert enthielten, wurde oftmals eine colony-PCR durchgeführt. Dazu wurden entweder Bakterien- oder Hefekolonien als Template verwendet. Bei der Vordenaturierung bei ca. 94°C werden die Plasmide freigesetzt und zugänglich gemacht. Ein in dieser Arbeit verwendeter Standard Ansatz für die colony-PCR war wie folgt:

H ₂ O bidest	12.8 µl
Taq-Puffer Y (10 x, Peqlab)	2 µl
dNTPs (2 mM)	2 µl
Primer (je 10 µM)	1 µl+1 µl
Template	1µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	<u>0,2 µl</u>
	20 µl

Als Template wurde 1 µl einer LB-Ampicillin-Flüssigkultur verwendet. Alternativ kann eine gepickte Kolonie direkt im colony-PCR-Ansatz resuspendiert werden. Es wurden entweder Insert-, oder Vektorspezifische (MCS-flankierende) Primer eingesetzt. Ein in dieser Arbeit verwendetes Standard-PCR-Programm für die colony-PCR war wie unter **2.11.3**, aber mit 4 min Vordenaturierung.

2.11.3.3 Verwendete Primer und Oligonukleotide

Sofern Primer selbst konstruiert wurden, wurde das Programm Primer 3 verwendet: <http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi>. Alle verwendeten Primer und Oligonukleotide sind in den Tabellen 1-3 aufgeführt

Tabelle 1: Allgemeine Primer und Oligonukleotide

Primername	Nucleotidsequenz (5'-3')	Beschreibung	T _A (°C)
SMART IIA-Oligo	AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CGC GGG	Clontech, SMART PCR cDNA Synthesis Kit, Erststrangsynthese	-
SMART CDS-II A	AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CT ₃₀ N ₋₁ N	Clontech, SMART PCR cDNA Synthesis Kit, Erststrangsynthese	-
5'PCR-Primer II A	AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT	Clontech, SMART PCR cDNA Synthesis Kit, LD PCR	68
SMART IV-Oligo	AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTG GCC ATT ACG GCC GGG	Creator SMART cDNA Library Construction Kit, Eststrangsynthese	-
SMART CDS-III/3'	ATT CTA GAG GCC GAG GCG GCC GAC ATG T ₃₀ N ₋₁ N	Creator SMART cDNA Library Construction Kit, Eststrangsynthese	68
PCR Primer 1	CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	Clontech, PCR Select, Adaptor-spezifisch	64
Nested Primer1	TCG AGC GGC CGC CCG GGC AGG T	Clontech, PCR Select, Adaptor-spezifisch, Nested PCR	80
Nested Primer2R	AGC GTG GTC GCG GCC GAG GT	Clontech, PCR Select, Adaptor-spezifisch, Nested PCR	70
18-M4UC	CGG TGA AAA AGG CAT CTC GTG	<i>Geosiphon</i> ; ribosomales Protein, Vorwärtsprimer	64
18-M4LC	TAT CAA TTT CTA TGT TGT CTG TGG	<i>Geosiphon</i> ; ribosomales Protein, Rückwärtsprimer	64
PMA5	CTC TCT TTT ATA CAC ACA TTC	pDR196SFI, MCS- flankierend	56
ADHclose	AAT ACG ACT CAC TAT AGG	pDR196SFI, MCS- flankierend	50
M13 (-20) fwd	GTA AAA CGA CGG CCA G	pCR4-TOPO, MCS flankierend	50
M13 rev	CAG GAA ACA GCT ATG AC	pCR4-TOPO, MCS flankierend	50
SP6	CAT ACG ATT TAG GTG ACA CTA TAG	pOO2SFI, MCS flankierend	66
T7	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	pCR4-TOPO, MCS flankierend	64
T3	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG	pCR4-TOPO, MCS flankierend	56
EF1-UC	AAG GCG ACA CTC TTG GGA TTA T	<i>Geosiphon</i> ; Elongationsfaktor <i>EF-1α</i> , Vorwärtsprimer	64
EF1-LC	CCA CCA CTG GGC ATC TCA TTT	<i>Geosiphon</i> ; Elongationsfaktor <i>EF-1α</i> , Rückwärtsprimer	64

Tabelle 2: Primer für die durch differentielles Screening isolierten cDNA-Sequenzen.

Primernamen	Nucleotidsequenz (5'-3')	Beschreibung	T _A (°C)
24-E11U	GGG AAA GAA ATT GGT TGT TAC TAT T	Vorwärtsprimer	64
24-E11L	GGG ATT TAT TCA CAT AAA AGT AGA T	Rückwärtsprimer	64
24-H4U	TCA ATT GAG CGA GTT TTA TGA GAT	Vorwärtsprimer	64
24-H4L	TCG AGA TAG GTA GAG GAT AGG T	Rückwärtsprimer	64
26-H3U	TAT TAT TAG AGG GGT AAA AAT GGT T	Vorwärtsprimer	64
26-H3L	CGA TGA TGA CGA TAA TGA TGA TGA	Rückwärtsprimer	64
27-H5U	CAC CCC AAA TGT CTC ACC TCA	Vorwärtsprimer	64
27-H5L	ACT GTA GAT TTA ATT AAA CAG ATC G	Rückwärtsprimer	64
EF1-UC	AAG GCG ACA CTC TTG GGA TTA T	Vorwärtsprimer	64
EF1-LC	CCA CCA CTG GGC ATC TCA TTT	Rückwärtsprimer	64

Tabelle 3: Zur Sequenzierung der *Gphx1*-cDNA verwendete Primer.

Primernamen	Nucleotidsequenz (5'-3')	Beschreibung	T _A (°C)
Y13-U1	ATC TTG TTC ACT CAA ATT ATC G	Vorwärtsprimer	60
Y13-U2	CAT CTG TAC CTG GAT GGA G	Vorwärtsprimer	58
Y13-U3	AGC AGC TTC GCT GGC AAT G	Vorwärtsprimer	60
Y13-U4	AAA ATG TTT GAA TCG GTT ACT C	Vorwärtsprimer	58
Y13-U5	GTG GCC TAA TTG GTG GTA TCT C	Vorwärtsprimer	66
Y13-L1	AAA TCC GGG TCG TAA AAG TTG TAA	Rückwärtsprimer	66
Y13-L2	TCA TTA TTT ACG AAA TCA AAT TTA A	Rückwärtsprimer	58
Y13-L3	CGC TTA CTC CAT ATG TAG GC	Rückwärtsprimer	60
Y13-L4	TGT GAA ATG AGG TAA CGT GGT	Rückwärtsprimer	60

2.11.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

Durch Agarosegelelektrophorese können DNA-Moleküle nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Entscheidende Faktoren für die Wanderungsgeschwindigkeit in der Gelmatrix sind Größe und elektrische Ladung des Nukleinsäuremoleküls, sowie die Durchschnittsgröße der Poren in der Gelmatrix, welche von der Agarosekonzentration abhängt und sich nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente richtet. Je größer diese sind, desto geringer wird die Agarosekonzentration gewählt. Die Agarose wurde in 1 x-TAE-Puffer angesetzt, durch Erhitzen in der Mikrowelle vollständig gelöst und nach leichter Abkühlung in einem Gelschlitten gegossen. Um die DNA anzufärben, wurde der noch flüssigen Agarose Ethidiumbromid zugegeben. Für ein Minigel mit einem Agarosevolumen von 25 ml wurden 1,5 µl einer Ethidiumbromid-Stocklösung von 10 µg/µl zugegeben und mit der Pipettenspitze gut „eingerrührt“. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen doppelsträngiger Nukleinsäuremoleküle und fluoresziert bei Anregung mit UV-Licht orange. Als Laufpuffer wurde 1 x-TAE-Puffer verwendet. Die DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen Blaumarker (MBI) versetzt und auf das nach dem Abkühlen polymerisierte Gel aufgetragen. Anschließend wurde das Gel in die Laufkammer (Eigenbau, Werkstätten der Technischen Universität Darmstadt) mit Laufpuffer gebracht und die DNA-Fragmente bei konstanter Spannung mit ca. 11 V/cm Gellänge aufgetrennt. Zur Reduzierung der Hintergrund-

fluoreszenz durch freies Ethidiumbromid und zur besseren Analyse komplexer DNA-Bandenmuster wurden manche Gele in Wasser entfärbt. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 312 nm (wenn DNA-Schädigungen gering gehalten werden sollten bei 365 nm) photographiert.

2.11.5 Konzentrationsmessung von doppelsträngiger DNA mit Hoechst 33258

Die Verwendung des ausschließlich in doppelsträngige DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes Hoechst 33258 erlaubt den Einsatz deutlich geringerer Mengen an DNA zur Konzentrationsbestimmung als es bei der Messung mit dem UV-Spektrometer möglich ist. Prinzip dieser Methode ist, dass durch Bindung des Farbstoffes an die kleine Furche der DNA-Doppelhelix das Fluoreszenzspektrum des Farbstoffes verschoben wird. Wenn der Farbstoff nicht an DNA gebunden ist, liegt das Maximum des Anregungsspektrums bei 356nm, das des Emissionsspektrums bei 492 nm, letzteres ist aber sehr schwach. Bindet der Farbstoff an DNA so verschieben sich diese Werte wie folgt: Anregung: 365 nm, Emission: 458 nm, die Fluoreszenz wird dabei aber sehr viel stärker. Die DNA-Messungen wurden mit dem „Hoefer DyNA Quant“-Messgerät (Amersham Biosciences) durchgeführt. Dieses Fluorimeter arbeitet mit feststehenden Wellenlängen, sowohl für die Anregung der Probe (365 nm \pm 7 nm), als auch für die Detektion des von der Probe emittierten Lichtes (460 nm \pm 15 nm). Zur Messung selbst wurde in eine 4 ml Quarzglasküvette (Hoefer DQ 105) zunächst 1 ml „Working dye solution“ (WDS) vorgelegt und damit das Gerät auf Null abgeglichen. Anschließend wurde 1 μ l der „Standardlösung-100“ zugegeben und das Gerät auf 100 ng/ml geeicht. Die Lösung wurde verworfen, die Küvette gespült und eine Kontroll-Messung mit der „Standardlösung-10“ durchgeführt. Wenn der Wert für die Kontrollmessung im Bereich 10 ng/ml \pm 1ng/ml lag, wurde mit der eigentlichen Messung der Proben begonnen. Für jede neue Messung wurde dabei zunächst ein Nullabgleich mit 1 ml WDS in der Küvette durchgeführt. Nach dem Nullabgleich wurde 1 μ l der zu messenden DNA-Probe zugegeben. Gemischt wurde durch Invertieren der mit Parafilm verschlossenen Küvette. Mit dieser Methode konnten DNA-Konzentrationen bis hinab zu 1 ng/ μ l gemessen werden

2.11.6 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen

Restriktionsenzyme erkennen kurze, spezifische Sequenzabschnitte innerhalb von DNA-Doppelsträngen. An diesen Sequenzen schneidet das Enzym den DNA-Doppelstrang durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen. Die dabei gebildeten Fragmente können entweder „glatt“ (blunt) oder „klebrig“ (sticky) sein. Bei den so genannten „sticky-ends“ bilden entweder die Basen des 5'-, oder des 3'-Endes des DNA-Fragmentes einen ssDNA-Überhang. Erkennungssequenz und Art der durch die Restriktion gebildeten Enden sind spezifisch für ein Restriktionsenzym. Als Orientierung für die in einem Ansatz benötigte Enzymmenge

wurde folgende Regel verwendet: 1 U eines Restriktionsenzym schneidet, bei der für das Enzym optimalen Inkubationstemperatur, 1 µg dsDNA in 1 h.

2.11.7 DNA-Reinigung mit Silikamembran-Säulen

Prinzip dieser Methode ist, dass DNA-Moleküle unter Hochsalzbedingungen an Glaspartikel binden. Wird die Salzkonzentration in einer wässrigen DNA-Lösung stark erhöht, so wird die Hydrathülle um die DNA aufgelöst. Dadurch werden die negativen Ladungen der DNA freigelegt. Anschließend wird die Lösung durch die Silikamembran einer Säule zentrifugiert. Die DNA bindet dabei reversibel an die positiven Ladungen der Glasbestandteile. Sie kann nun gewaschen und anschließend durch Zugabe von Wasser oder Puffern geringer Salzkonzentration wieder eluiert werden.

2.11.7.1 Gelextraktion von DNA

Die Gelextraktion dient der Isolation von DNA-Fragmenten, welche zuvor durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt wurden. Die Gelextraktionen wurden mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Das gewünschte DNA-Fragment wurde nach Beendigung der Elektrophorese (es wurden 1 %-Agarosegele verwendet) mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Der Schneidevorgang erfolgte unter langwelligem UV Licht (365 nm) und wurde so schnell wie möglich ausgeführt, um die DNA nicht zu schädigen. Anschließend wurde die Agarose in Hochsalzpuffer aufgelöst und die im Lysat enthaltene DNA durch Bindung an eine Silikamembran-Säule gereinigt. Die Extraktion wurde nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Elution erfolgte stets mit 50 µl sterilem H₂O bidest.

2.11.7.2 Reisolation von DNA aus Restriktionsansätzen

Um geschnittene DNA nach Abschluss der Restriktion von den Komponenten des Restriktionsansatzes zu reisolieren, wurde das „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) verwendet. Die DNA im zu reinigenden Ansatz wird unter Hochsalzbedingungen an eine Silikamembran-Säule gebunden, gewaschen und anschließend wieder von der Säule eluiert. Die Reinigung erfolgte nach den Angaben im Herstellerprotokoll. Die Elution erfolgte stets mit 50 µl sterilem H₂O bidest.

2.11.8 DNA-Entsalzung und Konzentrationserhöhung mit Microcon YM-100 Mikro-zentrifugationssäulen

Die „Microcon YM-100 Mikrozentrifugationssäulen“ enthalten eine semipermeable Membran. Diese ist für doppelsträngige DNA >100 bp unundurchlässig. Kleinere Nukleinsäuremoleküle, sowie Salze und Proteine kleiner als 100 kDa, werden durchgelassen. Das Volumen der zu reinigenden DNA wurde mit sterilem H₂O bidest auf maximal 500 µl erhöht und auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule zentrifugiert, danach blieb ein Endvolumen von

ca. 10-25 µl über der Membran zurück. Anschließend wurde die Säule umgedreht, in ein frisches Auffanggefäß gesteckt und die konzentrierte DNA-Lösung in das Gefäß zentrifugiert. Dauer und Geschwindigkeit der Zentrifugation entsprach dem Herstellerprotokoll (Version I 394H).

2.11.9 Klonierung von DNA

Die Ligation eines DNA-Fragmentes in einen Vektor, anschließende Transfektion des Vektors in einen Empfängerorganismus und die Isolation eines Klonen der diesen Vektor enthält, wird als Klonierung bezeichnet.

2.11.9.1 Vektoren

Vektoren werden dazu benutzt, um Fremd-DNA in Organismen zu übertragen. In dieser Arbeit waren dies entweder Bakterien oder Hefen. Ein Plasmid-Vektor besteht aus ringförmig geschlossener DNA und ist meist ein Abkömmling eines natürlich vorkommenden bakteriellen Plasmides. Wesentliche Elemente eines Vektors sind im Folgenden aufgeführt: Origin: Startpunkt für die *in vivo* Replikation des Vektors. Multiklonierungsstelle (MCS): Sequenzabschnitt des Vektors auf welchem die Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme dicht aufeinander folgen. In dieser Region kann der Vektor mit geeigneten Restriktionsenzymen aufgeschnitten und ein zu klonierendes DNA-Fragment eingesetzt werden. Die MCS wird meist von Primerbindestellen flankiert, so dass ein Insert sequenziert oder per PCR amplifiziert werden kann. Antibiotikaresistenzgen: Vermittelt Resistenz gegen ein Antibiotikum (zur Selektion).

Folgende Vektoren wurden verwendet:

pCR4-TOPO zur T/A-Klonierung von PCR-Produkten, siehe **2.11.9.4**, pDR196SFI zur heterologen Expression in der Hefemutante EBY VW4000, siehe **2.11.19.5**, und pOO2SFI zur cRNA-Herstellung für die heterologe Expression in *Xenopus laevis*-Oozyten, siehe **2.11.21.4.1**.

2.11.9.2 Verknüpfung von DNA-Fragmenten (Ligation)

Die Verbindung von doppelsträngigen DNA-Fragmenten durch Knüpfen von Phosphodiesterbindungen wird als Ligation bezeichnet. Als Enzym dafür wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Die Ligation wurde dazu benutzt, um lineare DNA-Fragmente in einen durch Verdau mit Restriktionsenzymen linearisierten Vektor einzubauen. Ein weiteres Verfahren bei welchem die Ligation eingesetzt wurde, war das Anheften von kurzen Adaptor-ssDNA-Sequenzen an die 5'- bzw. 3'-Enden von DNA-Fragmenten. Damit DNA-Fragmente miteinander ligiert werden können, müssen deren Enden entweder zueinander komplementäre Basenüberhänge („sticky-ends“) tragen oder glatt („blunt-ends“) vorliegen.

Um zu ligierende DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden zu versehen, wurden diese mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut.

2.11.9.3 Transfektion von Vektor-DNA in kompetente Zellen

Die Übertragung von DNA in eine lebende Zelle wird als Transfektion bezeichnet. Prinzipiell ist die Transfektion aller Arten von Zellen möglich, in dieser Arbeit wurde nur die chemische Transfektion von Bakterien und Hefen durchgeführt. Bakterien sind bereits von Natur aus in der Lage DNA aufzunehmen. Durch eine entsprechende chemische Behandlung kann diese Eigenschaft verstärkt werden. Bei der Transfektion solcher, chemisch kompetenter Bakterien wird die Zellmembran durch Zugabe von CaCl_2 und Inkubation auf Eis für DNA durchlässig gemacht. Ein einminütiger Hitzeschock bei ca. 42°C beendet das Protokoll für die Transfektion. Positive Klone können durch Selektion auf Antibiotikaresistenz identifiziert werden. Sofern nicht anders beschrieben, wurden für alle in dieser Arbeit gemachten DNA-Transfektionen *E.coli*-TOP 10 (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Die Transfektion wurde nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

2.11.9.4 Klonierung mit dem TOPO-TA cloning Kit

Zur Klonierung von PCR-Produkten wurde in dieser Arbeit das TOPO-TA cloning-Kit (Invitrogen, Karlsruhe) benutzt. Bei der TOPO-TA-Klonierung wird die terminale Transferase Aktivität von Taq-Polymerasen ausgenutzt. Am Ende eines jeden PCR-Zyklus fügt die Polymerase an die 3'-Enden von dsDNA ein einzelnes Nukleotid an (meist ein A). Dieser A-Überhang wird dazu benutzt, um beliebige PCR-Produkte in einen linearen Vektor zu ligieren, sofern dieser einen Überhang in Form eines einzelnen, 3'-überhängenden T besitzt. Der lineare Vektor des Kits (pCR4-TOPO, Abb. 10) ist an den überhängenden 3'-Enden mit der Topoisomerase I (von *Vaccinia virus*) kovalent verbunden. In Gegenwart des 5'-OH-Endes eines PCR-Produktes löst sich diese Bindung, die freiwerdende Energie wird zur Bildung der Phosphodiesterbindung zwischen 3'-Ende des Vektors und dem 5'-Ende des zu ligierenden PCR-Produktes verwendet. Das erhaltene Ligationsprodukt wurde direkt in kompetente *E.coli* transformiert. Die Selektion auf positive Klone erfolgte gleichzeitig mit zwei verschiedenen Methoden:

1.) Selektion auf Ampicillinresistenz: Der Vektor pCR4-TOPO enthält ein Ampicillinresistenzgen, welches den Ampicillin-sensitiven TOP10-Zellen nach Transfektion Resistenz vermittelt. Zellen, die kein Plasmid aufgenommen haben, können auf Ampicillinhaltigen Medien nicht wachsen.

2.) Selektion über das lethale *ccdB* Gen:

Durch die Ligation mit einem PCR-Produkt wird der Leserahmen des im Vektor pCR4-TOPO enthaltenen, für *E. coli* lethalen *ccdB*-Gen, unterbrochen. Dieses Gen ist mit dem *lacZ α* -Gen am C-Terminus fusioniert. Bei der Ligation mit einem PCR-Produkt kommt es zu einer

Unterbrechung zwischen *lacZα*-Gen und *ccdB*-Fusionsgen. Dadurch wird die Expression des Lethal-Gens unterbrochen. Dies bedeutet, dass ausschließlich Bakterienzellen mit in den Vektor ligierten Insert auf einer Kulturplatte wachsen, und nicht solche mit leerem Vektor.

Vektor pCR4-TOPO

Der im Kit verwendete Vektor pCR4-TOPO hat eine Größe von 3957 bp. Im Folgenden ist die Orientierung und Größe wichtiger Regionen auf dem Vektor angeführt: M13 reverse-priming-site: 205-221 bp, *lac*-promotor region: 2-216bp, *LacZα*-*ccdB*-gene-fusion: 217-810bp, T3-priming-site: 243-262 bp TOPO[®] cloning-site: 294-295 bp, T7 priming-site 328-347 bp, M13 forward (-20) priming-site: 355-370 bp, Kanamycin-resistance-gene: bp 1159-1953 bp, Ampicillin-resistance-gene: 2157-3017 bp, pUC-origin: 3162-3835 bp.

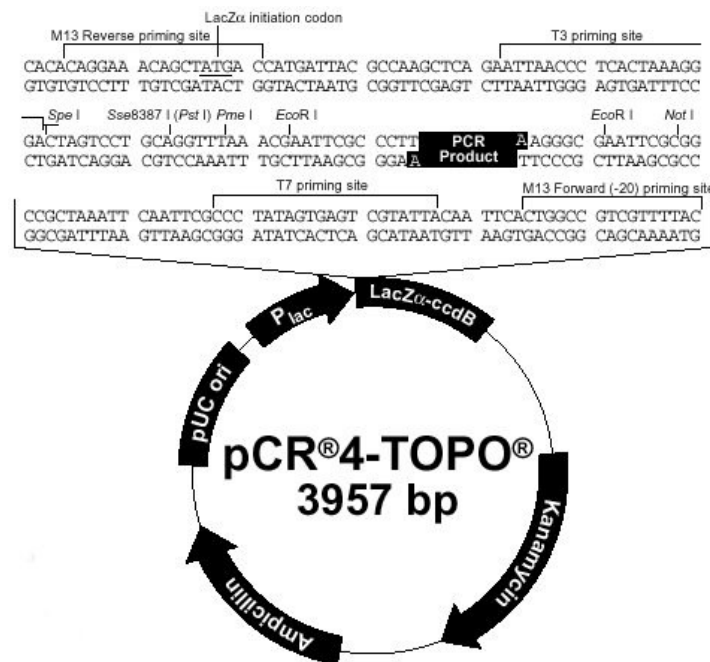


Abb. 10: Der Vektor pCR4-TOPO. Gezeigt sind die Bereiche der beiden Resistenzgene für Ampicillin und Kanamycin, der *in vivo* Replikationsstartpunkt (pUC ori), der Promotor für das *lac*-Operon (P_{lac}) und das *LacZα*-*ccdB*-Fusionsgen. Die dargestellte Sequenz repräsentiert den Vektor mit einem durch die TOPO-cloning Reaktion ligierten PCR Produkt. Die MCS wird von den Bindestellen für die Primer T3, T7 und M13 (forward und reverse) sowie diverser Restriktionsschnittstellen flankiert (aus dem Protokoll für das TOPO TA Cloning Kit, Version K, July 31, 2003, 25-0276).

Die Ligation und die anschließende Transfektion in TOP10 chemisch kompetente *E. coli* wurde nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

2.11.10 Übernachtskulturen von *E. coli*

Um einen *E.coli*-Klon zu vermehren, wurden Übernachtskulturen angelegt. Dazu wurden 10 ml LB-Ampicillin-Flüssigmedium (75 µg Amp/ml) mit einer Einzelkolonie angeimpft. Als Kulturgefäße wurden Glasreagenzröhrchen (Ø 1,5 cm, Länge 8 cm) verwendet. Als

Verschluss wurden Aluminiumkappen verwendet. Die angeimpften Kulturen wurden bei 37° C und mit 220 rpm über Nacht inkubiert.

2.11.11 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Aus einer *E.coli*-Flüssigkultur können die Plasmide der Bakterien präpariert werden. Zunächst wurde von dem entsprechenden *E. coli* -Klon eine Übernachtskultur angesetzt. Zur Plasmidpräparation wurde das „Qiaprep-spin Plasmid Kit“ (Qiagen, Hilden) verwendet. Das Protokoll des Kits basiert auf der Methode der alkalischen Lyse von Bakterienzellen. Durch eine anschließende Neutralisation des Lysats werden Proteine, Zelldebris und die Zellwandbestandteile mit daran haftender genomischer DNA ausgefällt. Im nächsten Schritt wird die Hydrathülle der freigesetzten Plasmid-DNA durch Herstellung von Hochsalzbedingungen im Ansatz aufgelöst. Das durch Zentrifugation geklärte Lysat wird durch die Silikamembran einer Säule zentrifugiert, gewaschen und wieder eluiert. Alle Schritte wurden entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Elution der wurde stets mit 50 µl sterilem H₂O bidest durchgeführt.

2.11.12 Glycerin-Dauerkulturen von *E. coli*

Zur dauerhaften Lagerung eines Klon bzw. des darin enthaltenen Plasmids wurden *E. coli*-Dauerkulturen angelegt. Dazu wurden 650 µl einer LB-Übernachtskultur des entsprechenden Klon mit 500 µl autoklaviertem Glycerin (100 %) gemischt und bei -80 °C gelagert.

2.11.13 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

Zur Sequenzierung eines Plasmidinserts wurde von einem entsprechenden Klon zunächst eine Übernachtskultur angelegt. Anschließend wurde eine Plasmidpräparation durchgeführt. Die präparierten Plasmide wurden direkt zur Sequenzierreaktion eingesetzt. Gereinigte DNA wurde von der Fa. AGOWA (Berlin) auftragssequenziert. Dabei wurde zumeist eine Sequenz von ca. 600-900 bp Länge erhalten. Zur Plasmidsequenzierung wurden die entsprechenden Vektorspezifischen Primer verwendet. Zur Sequenzierung von PCR-Produkten wurden die entsprechenden genspezifischen Primer eingesetzt. Die als Sequenzierungsergebnisse erhaltenen Chromatogramme wurden mit dem PC-Programm SEQASSEM (<http://science.domix.de/software.php>) assembliert und editiert. Anschließend wurden zusammengehörende Sequenzen eines Experiments mit dem PC-Programm ALIGN (<http://science.domix.de/software.php>) zu einem Alignment zusammengefasst. Zur Analyse der Sequenzen wurde ein BLAST-Vergleich (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool) mit Sequenzen in online-Datenbanken durchgeführt. Dazu wurde die folgende, online verfügbare Software verwendet:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (NCBI) und <http://www.ebi.ac.uk/blast2> (EMBL).
Folgende Werkzeuge der Software wurden jeweils benutzt: BLASTX, die DNA-Sequenz wird

jeweils in beiden Richtungen in allen 3 Leserastern zu einer Proteinsequenz übersetzt und mit Sequenzen in der Datenbank verglichen; BLASTP, die Sequenz wird als Proteinsequenz zur Analyse eingegeben. Zusätzlich zur Ähnlichkeit zu Proteinsequenzen in der Datenbank wird innerhalb der Sequenz nach konservierten Bereichen gesucht („NCBI conserved domain search“).

Zur weiteren Strukturanalyse von DNA-Sequenzen wurde die folgende, online verfügbare Software benutzt: NEB Cutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) und PC-Programm ALIGN (<http://science.do-mix.de/software.php>), für die Suche von offenen Leserastern in Proteinsequenzen. TMHMM V 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>), für die Suche von hydrophoben, Transmembran-Bereichen in Proteinsequenzen.

2.11.14 cDNA-Synthese mit dem „SMART-System“

Mit dem SMART cDNA Synthesis Kit (Clontech, BD Biosciences, Heidelberg) kann aus geringen Mengen polyA-RNA Vollängen-cDNA hergestellt werden. Bei der cDNA-Synthese mit diesem „SMART-System“ bindet zunächst ein degenerierter Oligo-dT Primer (SMART 3'-CDS Primer IIA) am 3'-polyA-Ende der RNA. An diesem Primer beginnt die Reverse Transkriptase (RT) die RNA zu cDNA umzuschreiben. Erreicht die RT das 5'-Ende der RNA, so heftet sie mittels ihrer terminalen-Transferase-Aktivität drei Moleküle C (Cytosin) an das 3'-Ende der Erststrang-cDNA. An dieses polyC-Ende kann das „SMART IIA Oligonukleotid“ binden, da es ein 3'-poly-G (Guanin)-Ende trägt. Die RT wechselt nun das Template („template switching“) und schreibt auch das Oligonukleotid zu cDNA um. Als Endprodukt der reversen Transkription erhält man einzelsträngige cDNA-Moleküle, welche an beiden Enden kurze Abschnitte definierter Sequenzen mit Primerbindestellen tragen. Mittels PCR und dem „5'-PCR Primer IIA“ können die cDNAs dann amplifiziert werden. Die kleinste als Ausgangsmaterial benötigte Menge an polyA-RNA beträgt ca. 25 ng. Für eine cDNA-Synthese mit dem SMART-System wurde die aus ca. 500 *Geosiphon*-Blasen isolierte polyA-RNA-Menge (siehe **2.11.2**) verwendet, dies waren ca. 80 ng. Eine schematische Darstellung der SMART-cDNA-Synthese ist in Abb. 11 dargestellt diese wurde, sofern im Folgenden nicht anders angegeben, nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

Ansatz für die Erststrangsynthese

polyA-RNA (ca. 80 ng)	3 µl
RNAse Inhibitor (Peqlab, 30 U/µl)	0,15 µl
SMART 3' CDS Primer IIA	1 µl
SMART IIA Oligonukleotid	<u>1 µl</u>
	5,15 µl

Der Ansatz wurde für 5 min bei 72° C im PCR-Cycler inkubiert. Anschließend wurde folgendes zugegeben:

Erststrangpuffer (5 x)	2 µl
RNAse Inhibitor (Peqlab, 30 µl)	0,3 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
DTT (Dithiothreitol) (20 mM)	1 µl
Power Script RT(1000 U/µl)	<u>1 µl</u>
	10,45 µl

Der Gesamtansatz wurde für 1 h bei 42° C im PCR-Cycler inkubiert. Für die folgende „Long Distance“ (LD) PCR wurden 2 µl dieses Endproduktes eingesetzt. Die LD-PCR wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, zur Amplifikation wurden 27 PCR-Zyklen verwendet. Um die Qualität der synthetisierten cDNA zu prüfen, wurden chemisch kompetente *E. coli* mit je 100 ng cDNA-Aliquots von verschiedenen polyA-RNA Isolationen transfiziert. Die Größe der Plasmidinserts von verschiedenen Klonen wurde mittels colony-PCR und dem 5'-PCR Primer IIA analysiert. Von ausgewählten Klonen wurden Übernachtskulturen angelegt und daraus die Plasmide präpariert. Anschließend wurden diese unter Verwendung der Primer T3 und T7 sequenziert. Bei der Analyse der Sequenziererergebnisse wurde geprüft, ob die Sequenzen von polyA und SMART-Oligo an den entsprechenden Enden der cDNAs zu finden waren. Anschließend wurden die cDNA-Sequenzen bzw. die Aminosäuresequenzen von identifizierten ORFs mittels BLAST-Analyse untersucht.

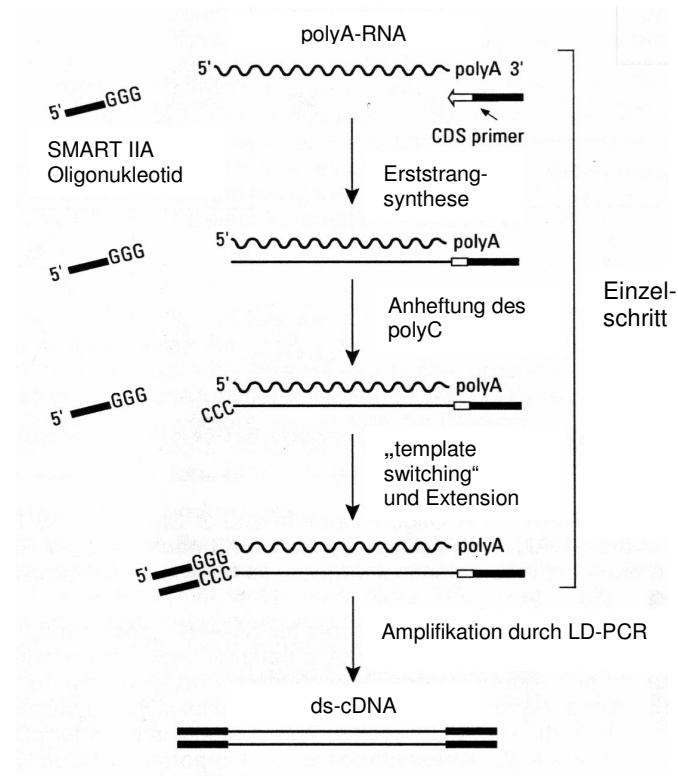


Abb. 11: Schematische Darstellung der cDNA Synthese mit dem SMART System (Aus dem Protokoll für das „Clontech SMART PCR cDNA Synthesis Kit“, Protocol # PT3041-1, Version # PR14594, May 2001).

2.11.15 Subtraktive Hybridisierung von cDNA aus im Licht bzw. im Dunkeln inkubierten *Geosiphon*-Blasen

Mit der subtraktiven Hybridisierung wurde versucht, aus im Licht bzw. im Dunkeln inkubierten *Geosiphon*-Blasen differentiell exprimierte Gene zu isolieren. Bei der subtraktiven Hybridisierung zweier cDNA-Proben wird denaturierte cDNA der einen Probe mit einem Überschuss an denaturierter cDNA der anderen Probe vereinigt. Danach wird die Temperatur reduziert und komplementäre Sequenzen können Hybriden bilden, diese werden dann abgetrennt. Die cDNAs die nur in der einen Probe, nicht aber in der anderen vorkommen bilden keine Hybriden und können isoliert werden. Das Protokoll des hier verwendeten „PCR Select cDNA Subtraction Kit“ (Clontech, BD Biosciences, Heidelberg) beruht auf dem Prinzip der so genannten "Suppression Subtractive Hybridization" (Diatchenko et. al, 1996). Diese Variante der subtraktiven Hybridisierung erlaubt eine selektive PCR-Amplifikation von Transkripten die nur in einer der beiden Proben vorkommen und wird im Folgenden, anhand der mit *Geosiphon*-Blasen durchgeführten Experimente, näher beschrieben. Zunächst wurden ca. 1200 *Geosiphon*-Blasen wie unter **2.11.2.1** beschrieben präpariert und in zwei Proben von jeweils ca. 600 Blasen in Petrischalen (Ø 90 mm) mit GM33-P-Medium aufgeteilt. Eine der Proben wurde für 72 h im Dauerlicht (ca. 120 µE) bei 18° C inkubiert. Die zweite Probe wurde mit Aluminiumfolie lichtdicht verpackt und zusammen mit der ersten Probe ebenfalls für 72 h bei 18° C gelagert. Dann wurde die polyA-RNA, wie unter **2.11.2.2** beschrieben, aus den Proben isoliert, zu cDNA (siehe **2.11.14**) umgeschrieben und mit dem Restriktionsenzym *Rsa* I in kleinere Fragmente mit „blunt-ends“ zerschnitten. Danach wurden an die cDNA der Probe welche die differentiell exprimierten Transkripte enthalten sollte, zwei unterschiedliche Adaptoren (1 und 2) ligiert. Die Adaptoren sind einzelsträngige DNA-Moleküle von ca. 40 Basen Länge und enthalten je zwei Primerbindestellen. Die erste Primerbindestelle ist bei beiden Adaptoren gleich und dient der PCR-Amplifikation von durch die subtraktive Hybridisierung erhaltenen, nur in der Tester-cDNA vorkommenden Hybriden. Die zweite, weiter innen liegende Primerbindestelle ist bei beiden Adaptoren verschieden und dient einer Nested-PCR-Amplifikation der Produkte aus der ersten PCR. Die Enden der Adaptoren sind dephosphoryliert, somit kann eine Ligation nur jeweils am 5'-Ende einer cDNA erfolgen. Die mit Adaptoren ligierte cDNA wird als „Tester“ bezeichnet. Die cDNA aus der Probe in welcher keine differentiell exprimierten Transkripte vorkommen sollten, wird als Treiber-cDNA bezeichnet. Die anschließend mit der Tester- und Treiber-cDNA durchgeführten Experimente lassen sich in drei Abschnitte aufteilen:

1.) Erste Hybridisierung

Im ersten Hybridisierungsschritt wurden die beiden Testeransätze jeweils mit dem 20fachen Überschuss an Treiber-DNA vermischt und denaturiert, ein anschließendes Absenken der

Temperatur erlaubte eine Reassoziierung. Bei dieser ersten Hybridisierung entstanden folgende Moleküle:

Typ a) Einzelsträngige Moleküle mit Adaptor. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein solches Molekül entsteht steigt, wenn diese Sequenz in der Treiber-cDNA nicht vorkommt und ist noch höher, wenn es sich um ein seltenes Transkript handelt. Letzteres bedeutet, dass verschiedene Konzentrationen solcher einzelsträngiger Moleküle ausgeglichen werden.

Typ b) Doppelsträngige Moleküle mit einem Adaptor an jedem Einzelstrang. Diese Moleküle entstehen zumeist aus Transkripten die nur in der Tester-cDNA vorkommen, aber in einer höheren Konzentration als die Moleküle vom „Typ a“ vorliegen.

Typ c) Doppelsträngige Moleküle die nur an einem Strang einen Adaptor tragen. Diese Moleküle können nur aus Transkripten entstehen die in Tester- und Treiber-cDNA vorkommen.

Typ d) Einzel- und doppelsträngige Moleküle ohne Adaptern. Diese Moleküle können nur aus Treiber-cDNA-Molekülen entstehen.

2.) Zweite Hybridisierung

Die beiden Ansätze aus der ersten Hybridisierung wurden ohne vorhergehendes Denaturieren miteinander vereinigt. Anschließend wurde nochmals frische, denaturierte Treiber-cDNA im 20fachen Überschuss zugegeben. Danach wurde die Temperatur wieder abgesenkt, so dass die Moleküle miteinander reassoziieren konnten. Diese zweite Hybridisierung verbesserte nochmals die Fraktionierung des gesamten cDNA-Pools in Moleküle vom Typ a-d. Zusätzlich konnten die Moleküle vom „Typ a“ aus beiden Ansätzen miteinander hybridisieren, daraus entstand ein neuer Molekültyp:

Typ e) Doppelsträngige Moleküle mit Adaptor 1 und Adaptor 2 die mit hoher Wahrscheinlichkeit nur in der Tester-cDNA vorkommen.

3.) PCR-Amplifikation

Nach der zweiten Hybridisierung wurde der entstandene Pool von Molekülen der Typen a-e, die so genannte „subtrahierte cDNA“, per PCR mit adaptorspezifischen Primern amplifiziert. Zunächst wurde eine so genannte „Auffüllreaktion“ durchgeführt, dabei ergänzte die Taq-Polymerase die einzelsträngigen Adaptern zu Doppelsträngen. Dadurch wurden Sequenzabschnitte zur Primerbindung in die cDNA-Fragmente eingeführt. Bei der folgenden PCR und anschließender Nested-PCR mit der „subtrahierten cDNA“ wurde nur der „Typ e“ exponentiell amplifiziert:

Typ a) Diese Moleküle werden nicht amplifiziert, da sie keine Primerbindestelle besitzen.

Typ b) Die Einzelstränge dieser Moleküle besitzen am 5'-, und am 3'-Ende komplementäre Adaptersequenzen. Diese Moleküle können sowohl Primer binden und exponentiell amplifiziert werden, als auch mit sich selbst hybridisierend ein ringförmiges Molekül bilden. Die Bildung des ringförmigen Moleküls erfolgt leichter und ist stabiler als die Bindung mit den

Primern (Diatchenko et al., 1996). Die exponentielle Amplifikation der Moleküle von „Typ b“ wird durch diesen, so genannten „Suppression-PCR-Effekt“ weitgehend verhindert.

Typ c) Diese Moleküle mit Primerbindestellen an nur je einem Ende der beiden Einzelstränge werden nur linear amplifiziert.

Typ d) Moleküle dieses Typs besitzen keine Primerbindestelle und werden nicht amplifiziert.

Typ e) Diese Moleküle haben je eine Primerbindestelle auf den beiden verschiedenen Adaptoren und werden durch PCR und Nested-PCR exponentiell amplifiziert.

Eine schematische Darstellung des Ablaufs der subtraktiven Hybridisierung ist in Abb. 12 dargestellt. Alle Experimente der subtraktiven Hybridisierung wurden nach dem Protokoll für das „Clontech PCR-Select cDNA Subtraction Kit“ durchgeführt.

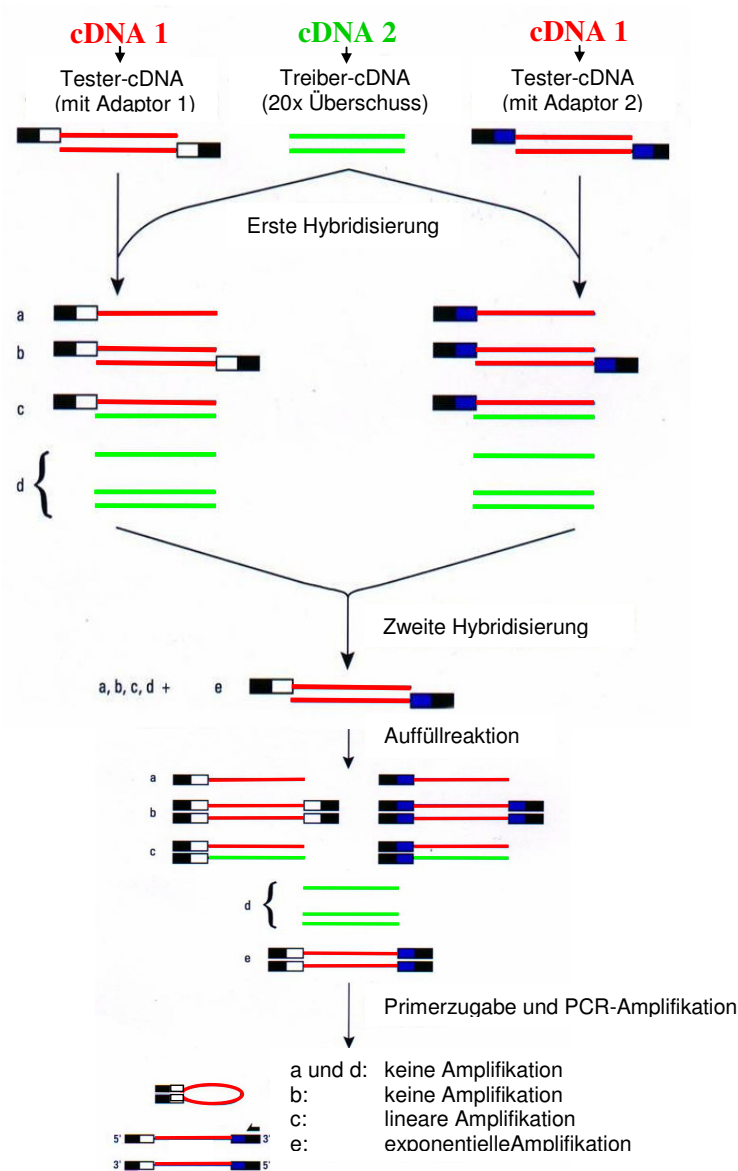


Abb. 12: Schema der subtraktiven Hybridisierung nach dem Prinzip der "Suppression Subtractive Hybridization" (nach dem Protokoll für das „Clontech PCR-Select cDNA Subtraction Kit“, Protocol # PT 1117-1, Version # PR06687, June 2000).

2.11.16 Kontrollexperimente zur subtraktiven Hybridisierung

2.11.16.1 Effizienz der Adaptorligation an die Tester-cDNA

Die Überprüfung ob, und wie effektiv die Adaptern an die Tester-cDNA ligiert wurden, wurde mit einer PCR durchgeführt. Dazu wurde ein genspezifischer Primer mit einem adaptorspezifischen Primer kombiniert. Als Kontrolle wurde die gleiche PCR mit beiden genspezifischen Primern durchgeführt. Die verwendeten, genspezifischen Primer (18M4-UC und 18M4-LC) binden innerhalb des Gens für ein ribosomales Protein aus *Geosiphon pyriformis*. Der adaptorspezifische Primer (PCR-Primer1) bindet auf dem T7-Promotorsequenzabschnitt der Adaptern 1 und 2. Die Ansätze mit beiden Primerkombinationen waren wie folgt:

1.) Ansatz mit gen-, und adaptorspezifischem Primer: 18M4-UC (Vorwärts-Primer) und PCR-Primer1 (Rückwärts-Primer)

Bei diesem Ansatz kann nur ein PCR-Produkt (ca. 400 bp) entstehen, wenn an die entsprechende cDNA ein Adaptor ligiert ist. Das PCR-Produkt muss zudem größer sein, als das bei Ansatz 2 zu erwartende, da es den Bereich zwischen adaptor-, und genspezifischem Sequenzbereich umfasst. Die Stärke der zu erwartenden Bande auf dem Agarosegel sollte mindestens 25 % der Bandenstärke von Ansatz 2 betragen wenn die Effizienz der Adaptorligation ausreichend war.

2.) Ansatz mit genspezifischem Primerpaar: 18M4-UC und 18M4-LC

Bei diesem Ansatz mit einem genspezifischen Primerpaar sollte in jedem Fall ein PCR-Produkt entstehen, unabhängig davon ob an die entsprechende Sequenz ein Adaptor ligiert ist. Zudem muss es kürzer (ca. 270 bp) sein als das Produkt aus Ansatz 1.

Die Ansätze 1 und 2 wurden jeweils mit den Tester cDNAs 1 und 2 sowohl von der Vorwärts-, als auch von der Rückwärtssubtraktion durchgeführt.

2.11.16.2 Rückwärtssubtraktion

Parallel zur bereits beschriebenen Vorwärtssubtraktion wurde eine so genannte Rückwärtssubtraktion durchgeführt. Der Unterschied zum bereits beschriebenen Experiment, welches als Vorwärtssubtraktion bezeichnet wird, liegt darin dass die cDNA-Populationen für Tester und Treiber vertauscht werden. Die cDNA, an welche bei der Vorwärtssubtraktion die Adaptern ligiert wurden, fungierte dann als Treiber-cDNA. An die vorherige Treiber-cDNA wurde in diesem Fall die Adaptern ligiert. Somit erhält man cDNA-Moleküle die spezifisch nur in dem Ansatz vorkommen, welcher bei der Vorwärtssubtraktion als Treiber fungiert hat. Eine schematische Übersicht über den gesamten Versuchsablauf von Vorwärts- und Rückwärtssubtraktion ist in Abb. 13 dargestellt. Die PCR-Produkte aus der Rückwärts- und Vorwärtssubtraktion wurden bei den Kontrollexperimenten bei der subtraktiven Hybridisierung und des differentiellen Screenings jeweils parallel verwendet. Somit konnten die Ergebnisse beider Ansätze jeweils miteinander verglichen werden.

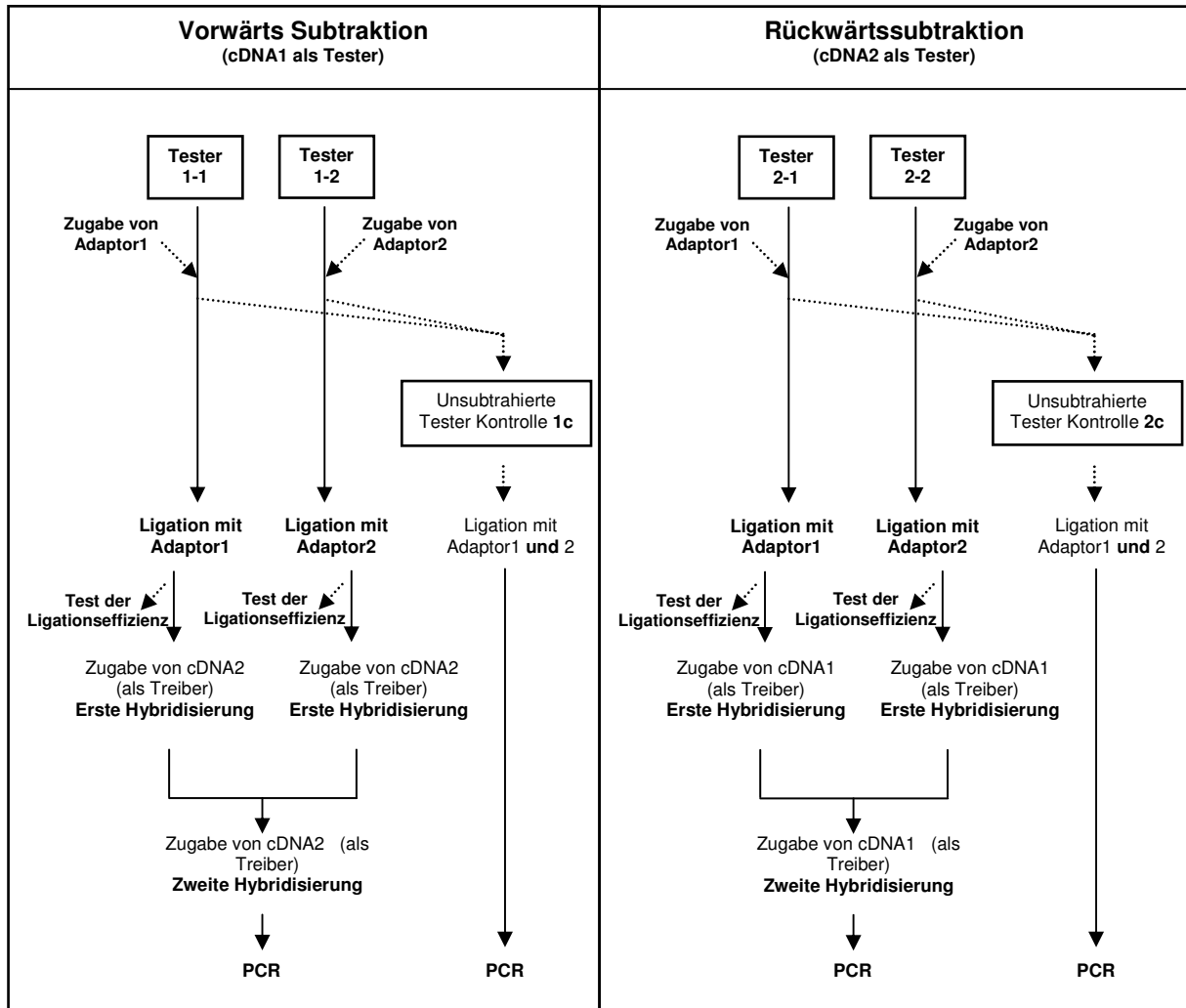


Abb. 13: Versuchsablauf der subtraktiven Hybridisierung (Nach dem Protokoll für das „Clontech PCR-Select cDNA Subtraction Kit“, Protocol # PT 1117-1, Version # PR06687, June 2000).

2.11.16.3 Kontrolle der Subtraktionseffizienz: PCR-Amplifikation unsubtrahierter cDNA

Von jeder Subtraktion (Vorwärts und Rückwärts) wurde ein Aliquot so genannter „unsubtrahierter cDNA“ hergestellt. Von den Ligationsansätzen der Adaptoren 1 und 2 (siehe Abb. 13) wurde je ein Aliquot abgenommen. Die Aliquots wurden gemischt und die enthaltene cDNA an beide im Ansatz befindlichen Adaptortypen ligiert. Diese Kontrollansätze wurden nicht mit Treiber-cDNA hybridisiert, sondern direkt als Template für die PCR, parallel zur PCR subtrahierter cDNA als Template, eingesetzt. Die Agarosegel-Bandenmuster der Nested-PCR-Produkte von „subtrahierter“ und „unsubtrahierter“ cDNA wurden miteinander verglichen. Diese sollten sich, nach einer erfolgreichen Subtraktion, deutlich voneinander unterscheiden.

schematische Darstellung der Experimente des differentiellen Screenings und deren Zusammenhang mit der subtraktiven Hybridisierung ist in Abb. 14 dargestellt. Zunächst wurde das Nested-PCR-Produkt aus der Vorwärtssubtraktion in chemisch kompetente *E. coli* kloniert. Mit je einer der gewachsenen Kolonien wurde je ein Well einer 96er-Mikrotiterplatte, mit rechteckigem Boden und 400 µl Inhalt pro Well, angeimpft. Als Medium wurden je Well 100 µl LB-Ampicillin-Flüssigmedium verwendet. Die Platten wurden mit dem dazugehörigen Deckel verschlossen, auf einem Schüttler fixiert und bei 37° C und 215 rpm für 14 h inkubiert. Zur Lagerung der gewachsenen Klone wurde zu jedem Well 100 µl Glycerin (100 %) zugegeben und die Wells gemischt. Abschließend wurde die Platte mit Kunststoff-Folie (Amplification Tape DNase/RNase-free, 3M Adhesive Technology, Polyolefin, 1221 mm x 79 mm, Nunc GmbH, Wiesbaden) verschlossen und bei -80° C gelagert. Die Plasmidinserts der Klone wurden per colony-PCR mit adaptorspezifischen Primern (Nested1 und Nested2R) amplifiziert. Als Template wurde je 1 µl der LB-Kultur eingesetzt. Die denaturierten colony-PCR-Produkte von 96 Klonen wurden nach Analyse auf einem 2 %-Agarosegel, einzelsträngig auf eine positiv geladene Nylonmembran („Pall Biodyne B Nylon Membrane“, 115 mm x 76 mm, Nunc, Wiesbaden) geblottet. Als Negativkontrolle für die Hybridisierung wurden zwei cDNA-Fragmente menschlicher Herkunft geblottet. Von einem solchen Blot wurden vier identische Exemplare hergestellt. Um die cDNA auf der Membran zu fixieren, wurden die Blots bei 70° C für zwei Stunden im Wärmeschrank gebacken. Je einer der Blots wurde mit einem der folgenden, radioaktiv markierten Nested-PCR-Produkte hybridisiert:

- 1.) cDNA aus der Vorwärtssubtraktion
- 2.) cDNA aus dem dazugehörigen Kontrollansatz (unsubtrahierte cDNA 1-c)
- 3.) cDNA aus der Rückwärtssubtraktion
- 4.) cDNA aus dem dazugehörigen Kontrollansatz (unsubtrahierte cDNA 2-c)

Als Hybridisierungs-Lösung wurde die „Clontech ExpressHyb Hybridisation Solution“ (BD Biosciences Clontech, Heidelberg) verwendet. Die radioaktive Markierung der cDNAs 1-4 wurde von der Firma „Hartmann ANALYTIC GmbH“ in Braunschweig, durchgeführt. Markiert wurde die cDNA mit [α -³²P] dCTP nach der Methode des „random primer labeling“. Dabei wird die cDNA denaturiert und der jeweilige Komplementärstrang, nach dem Annealing von zufällig bindenden Primern mit einer DNA-Polymerase neusynthetisiert. Die im Ansatz zugegebenen dNTPs enthalten bei dieser Reaktion kein dCTP. Von den cDNA-Proben wurden jeweils 75 ng radioaktiv markiert. Zu den vier Hybridisier-Lösungen wurde je eine der markierten cDNAs mit einer Gesamtaktivität von 10⁷ cpm zugegeben. Zur Vorhybridisierung und Hybridisierung wurden die Blots dann in jeweils eine Duran-Glasröhre (Ø 5 cm) mit Kunststoff-Schraubverschluss geschoben. Die Blots lagen an der Innenwandung des Hybridisiergefäßes an; die Seite mit der geblotteten cDNA lag dabei oben. Zur Inkubation

waren die verschlossenen Hybridisiergefäße waagrecht in die Halterungen des Hybridisierungsofens (Standardgröße, Bachofer, Reutlingen) gespannt. Während der Vorhybridisierung wurden die Adaptorsequenzen der geblotteten cDNA mit den entsprechenden Komplementärsequenzen hybridisiert („blocking“).

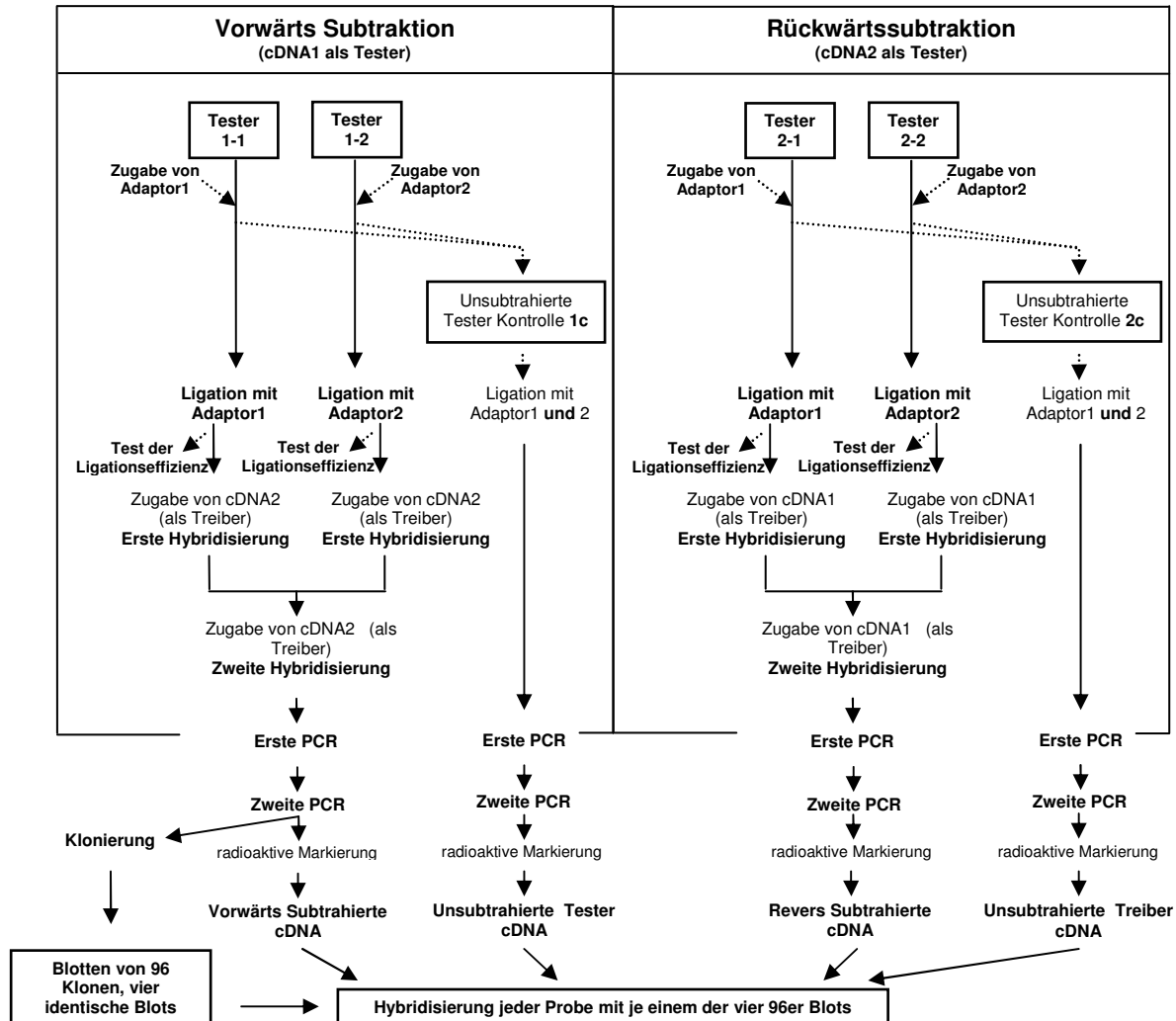


Abb. 14: Übersicht über die subtraktive Hybridisierung und das folgende differentielle Screening (Nach dem Protokoll für das „Clontech PCR-Select Differential Screening Kit“, Protocol # PT3138-1, Version # PR94873, May1999).

Die Auswertung der hybridisierten und gewaschenen Blots erfolgte mittels eines Phosphorimagers (FLA3000, Fuji). Zur Löschung alter Signale wurde der zu verwendende Screen für 15 min im Gerät mit entsprechendem Licht bestrahlt. Anschließend wurden die Blots in Kunststoff-Folie verpackt, und zusammen mit dem Screen in einer lichtdichten Kassette für 3 h inkubiert. Die β -Strahlung der markierten cDNA erzeugt auf dem Screen eine Abbildung des Blots, welche durch einscannen des Screens im Phosphorimager sichtbar gemacht wurde. Zur Auswertung der Bilder wurde die zum Phosphorimager gehörende Software „Fujifilm Image Gauge“ verwendet. Aus dem Intensitätsunterschied eines Signals auf den verschiedenen Blots konnte eine Aussage über das differentielle

Vorkommen des entsprechenden Transkripts in Tester- und Treiber-cDNA getroffen werden. Die vier Blots der Hybridisierungsexperimente wurden nach dem folgenden, in Abb. 15 dargestellten Modell ausgewertet (Nach Protokoll für das „PCR-Select Differential Screening Kit“, Protocol # PT3138-1, Version # PR94873, May1999).

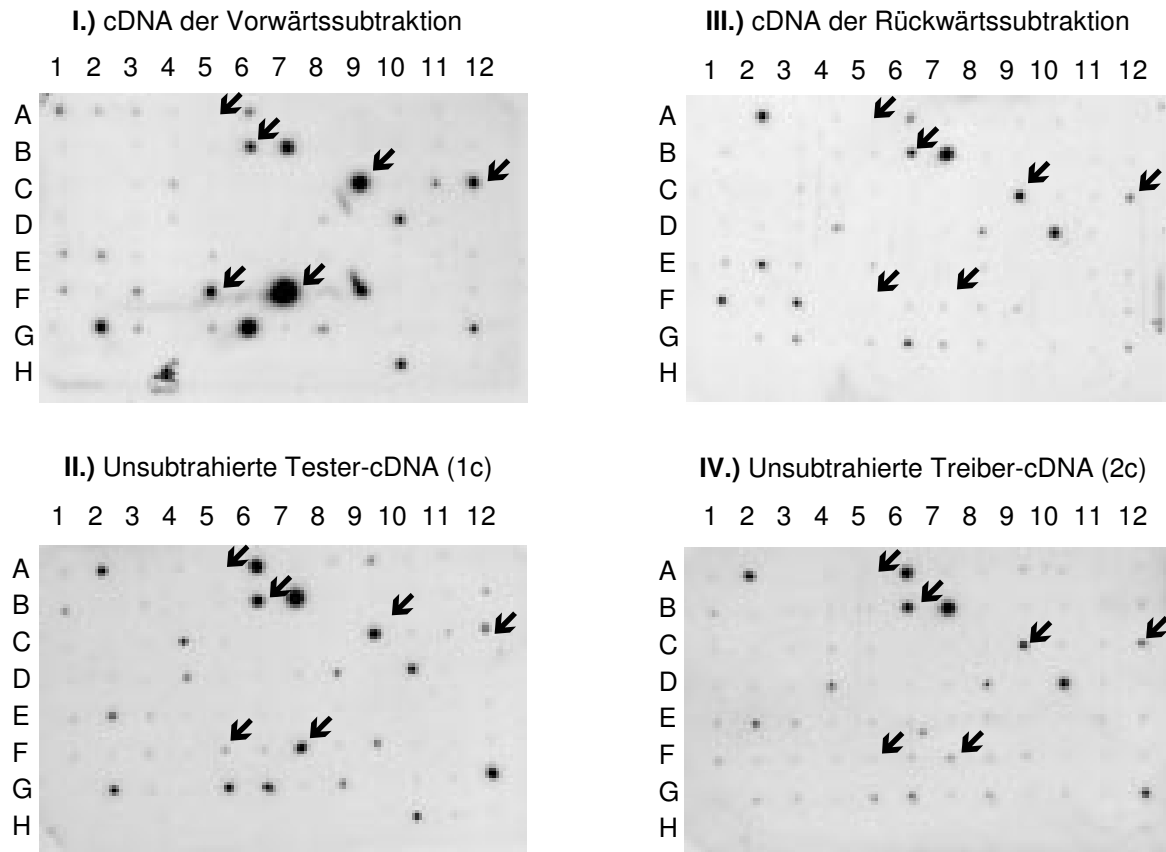


Abb. 15: Abbildungen verändert aus dem Protokoll für das „Clontech PCR-Select Differential Screening Kit“, Protocol # PT3138-1, Version # PR94873, May1999“. An den Positionen H11 und H12 wurden jeweils die Negativkontrollen aufgetragen. Subtrahiert wurde die cDNA folgender Zelllinien: γ (Tester), produziert γ -Globin, und β (Treiber) produziert β -Globin. Aus subtrahierten und klonierten cDNAs der Vorwärtssubtraktion wurden vier identische Blots hergestellt. Die Blots wurden jeweils mit einer von vier verschiedenen, radioaktiv markierten cDNAs hybridisiert. Über einem Blot ist die jeweilige cDNA mit der hybridisiert wurde angegeben.

Auf den Blots in Abb. 15 kann man folgende Arten von Hybridisierungssignalen erkennen:

cDNA die bei I. Hybridisierung zeigt, nicht aber bei II., III. und IV.

Diese ist mit >95 % Wahrscheinlichkeit nur in der Tester-cDNA enthalten (F5).

cDNA die bei I. und II. Hybridisierung zeigt, nicht aber bei III. und IV.

Diese ist mit 95 % Wahrscheinlichkeit nur in der Tester-cDNA enthalten (F7).

cDNA die bei I., II. und bei IV. Hybridisierung zeigt, nicht aber bei III.

Das entsprechende Gen ist mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht differentiell exprimiert, die Transkripte sind zufällig angereichert. Eine weitere Möglichkeit zur differentiellen Anreicherung besteht, wenn Transkripte unterschiedlicher Längen in Tester und Treiber

vorhanden sind. Dies kann der Fall sein wenn es sich um unterschiedlich gespleisste Isoformen der Transkripte eines Genes handelt. Problematisch ist auch, wenn ein Transkript von einem Gen abstammt welches zu einer Multigenfamilie gehört. In den beiden letztgenannten Fällen würde es sich, trotz des scheinbaren falschpositiven Ergebnisses, dennoch um differentiell exprimierte Transkripte handeln.

cDNA die bei I., II., III. und IV. Hybridisierung zeigt

Das entsprechende Gen ist nicht differentiell exprimiert. Beträgt jedoch die Differenz zwischen der Intensität der Signale von I. und III. mehr als das fünffache, so kann es sich dennoch um ein differentiell exprimiertes Transkript handeln (C9). Ist die Differenz der Signalintensität kleiner als das dreifache, so handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine zufällige Anreicherung (C12). Die Gene von cDNAs, welche bei allen vier Blots eine Hybridisierung gleicher Intensität zeigen, sind mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht differentiell exprimiert (B6).

cDNA die bei I., II. und bei III. und IV. keine Hybridisierung zeigt

Das entsprechende Gen ist nicht differentiell exprimiert. Speziell cDNA, die selbst bei I. keine Hybridisierung zeigt, entspricht einem nichtdifferenziell exprimierten Gen, dessen cDNA in der subtrahierten cDNA nur zufällig und in sehr geringer Konzentration vorkommt (A5). Diese cDNA findet selbst in der cDNA aus der Vorwärtssubtraktion keine korrespondierende Sequenz (z.B. der linearen PCR-Amplifikation entstammende Moleküle vom Typ c bei der subtraktiven Hybridisierung).

Alle cDNAs bzw. die Plasmidinserts der entsprechenden Klone, deren Hybridisierungssignal auf eine differentielle Expression des korrespondierenden Genes hindeutete, wurden unter Verwendung des Primers T3 sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mittels BLAST-Analyse untersucht.

2.11.18 Überprüfung der Resultate des differentiellen Screenings durch RT-PCR

Die differentielle Expression der durch das differentielle Screening unter **2.11.17** identifizierten Gene sollte geprüft werden. Aus den zu untersuchenden Genen bzw. deren cDNA-Sequenzen wurden zunächst genspezifische Primerpaare abgeleitet. Anschließend wurden erneut *Geosiphon*-Blasen im Licht und im Dunkeln inkubiert. Aus den Blasen wurde polyA-RNA isoliert und daraus cDNA hergestellt. Diese cDNA wurde als Template für PCR-Reaktionen mit den Primern für die zu untersuchenden Gene eingesetzt. Wird ein Gen differentiell exprimiert, so sollte sich dies in unterschiedlichen cDNA-Konzentrationen in den Proben niederschlagen. Nach der PCR-Amplifikation solcher Proben mit entsprechenden Primern sollten unterschiedliche Bandenstärken auf einem Agarosegel sichtbar werden.

2.11.18.1 Präparation und Inkubation von *Geosiphon*-Blasen

Pro Ansatz wurden 50 Blasen, wie unter **2.11.2.1** beschrieben, präpariert. Die Ansätze wurden in getrennten 90 mm-Petrischalen in GM33-P-Medium zunächst für ein bis zwei Tage im normalen Tag-Nachtrhythmus (siehe **2.11.1**) inkubiert. Danach wurden die Proben für verschiedene, definierte Zeiten im Licht oder im Dunkeln (Bedingungen wie unter **2.11.15**) inkubiert. Zur Probenentnahme wurden die Blasen in ein 2 ml-Eppendorfgefäß überführt und nach dem Entfernen des Mediums in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die einzelnen Proben wurden wie folgt inkubiert: **D₀**: Probe wurde aus dem normalen Tag-Nacht Rhythmus morgens, unmittelbar vor Beginn der Beleuchtung, nach 8 h Dunkelphase entnommen. **D₇₂**: Die Petrischale dieser Probe wurde, parallel zur Entnahme der Probe D₀, in Aluminiumfolie lichtdicht verpackt, zusammen mit den Lichtproben für 72 h inkubiert. **H₃**: 3 h Licht, **H₆**: 6 h Licht, **H₁₂**: 12 h Licht, **H₃₆**: 36 h Licht, **H₇₂**: 72 h Licht

2.11.18.2 polyA-RNA Isolation

Die polyA-RNA aus den unter **2.11.18.1** inkubierten Blasen wurde wie unter **2.11.2.2** beschrieben isoliert. Aufgrund der geringeren Anzahl der Blasen wurden die Mengen der eingesetzten Materialien wie folgt verändert:

<u>Dynabeads Suspension:</u>	20 µl
<u>Waschpuffer A:</u>	100 µl
<u>Waschpuffer B:</u>	100 µl

Nach dem letzten Waschschrift wurde die polyA-RNA nicht von den Dynabeads eluiert sondern in 100 µl Tris-HCL (10 mM, im Kit enthalten) resuspendiert und anschließend auf Eis bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

2.11.18.3 cDNA-Erststrangsynthese

Bei der hier durchgeführten cDNA-Erststrangsynthese war isolierte polyA-RNA an das polyT der Dynabeads gebunden. Dieses polyT diente als Primer für die zur reversen Transkription von geringen Mengen polyA-RNA (< 50 ng) geeignete „Sensiscript Reverse Transkriptase“ (Qiagen, Hilden).

Ansatz für die reverse Transkription

Die unter **2.11.18.2** erhaltenen polyA-RNA-Ansätze wurden in einem Magnethalter pelletiert, danach wurde das Tris-HCL entfernt. Zu den Pellets wurde folgendes zugegeben:

RT Puffer (10 x)	2 µl
dNTPs (5 mM, aus Kit)	2µl
RNAse Inhibitor (30 U/µl, Peqlab)	0,35 µl
Reverse Transkriptase (4 U/µl)	1 µl
H ₂ O (RNAse frei, aus Kit)	<u>4,65 µl</u>
	20 µl

Die Ansätze wurden bei 37° C für 1 h im PCR-Cycler inkubiert. Anschließend wurde jeder Ansatz mit 80 µl H₂O bidest zu einem Gesamtvolumen von 100 µl verdünnt. Nach der reversen Transkription ist die Erststrang-cDNA noch mit der polyA-RNA hybridisiert. Die Gegenwart solcher Nukleinsäure-Hybriden aktiviert die RNase H-Funktion der hier verwendeten RT. Dadurch wird die polyA-RNA abgebaut und die cDNA liegt anschließend als Dynabeads-gekoppelter Einzelstrang vor.

2.11.18.4 PCR-Amplifikation mit den genspezifischen Primern

Die unter 2.11.18.3 erhaltene, einzelsträngige cDNA ist kovalent mit den Dynabeads verbunden. Wird diese cDNA als Template in einer PCR eingesetzt, so kann sie mittels eines Magneten wieder aus dem Ansatz zurückgewonnen werden. Somit steht diese so genannte „solid Phase cDNA“ für mehrere PCR-Amplifikationen mit verschiedenen Primern zur Verfügung. Alle hier verwendeten Primerpaare hatten eine Annealingtemperatur von 64° C. Die PCR mit einem der genspezifischen Primerpaare wurde wie folgt vorgenommen: Von den sieben cDNA Proben (siehe 2.11.18.1 und 2.11.18.3) wurde je ein 12,5 µl-Aliquot in ein frisches 0,25 ml-Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurden die restlichen PCR-Komponenten zugegeben:

H ₂ O 4dest	1,3 µl
Taq-PufferY (10 x, Peqlab)	2 µl
dNTPS (2 mM, Peqlab)	2 µl
Primer (10 µM)	1 µl+1 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl, Peqlab)	<u>0,2 µl</u>
	20 µl

Um die „solid Phase cDNA“ nicht zu großen Belastungen durch hohe Temperaturen bzw. dauernde Temperaturwechsel auszusetzen, wurden die Ansätze zunächst „voramplifiziert“. Zur Voramplifikation wurde folgendes Programm verwendet:

Vordenaturieren:

94° C 1,5 min

Zwei Wiederholungen:

94° C 30 s

62° C 30 s

72° C 5 min

Abschließendes Denaturieren:

94° C 2 min

Durch die Abschluss-Denaturierung wurde die „solid Phase cDNA“ vom zuletzt gebildeten Komplementärstrang getrennt. Vor der Reassoziaton der DNA-Moleküle wurden die Reaktionsgefäße vom PCR-Cycler in einen Magnetständer überführt und die Überstände jeweils in ein frisches 0,25 ml-Eppendorfgefäß überführt. Die zurückbleibenden „solid Phase

cDNA“-Pellets wurden mit 20 µl Tris-HCL (10 mM, Dynabeads mRNA DIRECT Kit) zweimal gewaschen und in je 20 µl Tris-HCL bei 4° C gelagert. Die voramplifizierten Reaktionsansätze wurden wie folgt weiteramplifiziert:

Vordenaturieren:

94° C 1,5 min

42 Wiederholungen:

94° C 30 s

62° C 30 s

72° C 1,5 min

Nachamplifikation:

72° C 7 min

Die hier vorgegebene Anzahl von 43 PCR-Zyklen ergab sich aus vorausgehenden Kontrollexperimenten, welche nach dem vorgehend beschriebenen Muster mit 50 *Geosiphon*-Blasen durchgeführt wurden. Daraus ergab sich, dass die PCR mit den hier verwendeten Templatemengen nach 40-45 Zyklen auf dem Agarosegel sichtbare Produkte ergab. Die Bandenintensität dieser PCR-Produkte zeigte, dass sich die PCR-Amplifikation noch im exponentiellen Bereich befand. Dies war wichtig, da die für dieses Experiment entscheidenden Template-Konzentrationsunterschiede in der Plateauphase der PCR egalisiert werden. Abschließend wurde kontrolliert, ob die gesamte Templatemenge in allen Ansätzen gleich war. Dazu wurde eine Kontroll-PCR mit Primern für den konstitutiv exprimierten Elongationsfaktor *EF-1α* von *Geosiphon* (EF1-UC und EF1-LC) durchgeführt. Alle erhaltenen PCR-Produkte wurden auf einem 2 % Agarosegel analysiert. In Tabelle 2 sind alle in diesem Experiment verwendeten Primer aufgeführt

2.11.19 Herstellung einer gerichtet klonierten und nach Größe fraktionierten Hefe-expressions-cDNA-Bank von *Geosiphon pyriformis*

Um eine funktionelle Hefekomplementation durchführen zu können, wurde eine gerichtet klonierte, nach Größe fraktionierte cDNA-Bank von *Geosiphon* in dem Hefe-Expressionsvektor pDR196SFI angelegt.

2.11.19.1 polyA-RNA-Isolation

Zunächst wurden 650 *Geosiphon*-Blasen, wie unter **2.11.2.1** beschrieben präpariert, die polyA-RNA wurde wie unter **2.11.2.2** beschrieben isoliert.

2.11.19.2 cDNA-Synthese

Aus der unter **2.8.19.1** erhaltenen polyA-RNA wurde cDNA hergestellt. Dazu wurde auf das unter **2.8.14** beschriebene „SMART-System“ zurückgegriffen. Für dieses Experiment wurde jedoch das „Creator SMART cDNA Library Construction Kit“ (Clontech, BD Biosciences,

Heidelberg) benutzt. Das Funktionsprinzip dieses Kits unterscheidet sich von dem des bereits beschriebenen SMART-Kits dadurch, dass ein modifiziertes Oligonukleotid („SMART IV Oligonukleotid“), ein modifizierter CDS-Primer (CDSIII/3'-PCR Primer) sowie entsprechend veränderte Primer für die LD-PCR-Amplifikation verwendet werden. Diese Primer tragen zwei unterschiedliche Schnittstellen (*Sfi* IA und *Sfi* IB, siehe Abb. 16) für das Restriktionsenzym *Sfi* I. Über diese assymetrischen Schnittstellen kann die cDNA „gerichtet“ kloniert werden. Dies bedeutet, dass im Vektor auf den Promotor vor der MCS stets das 5'-Ende des Inserts folgt.

A	<u>Allgemeine Erkennungssequenz von <i>Sfi</i> I:</u>	
	5'-GGCC NNNNN GGCC-3'	
	3'-CCGG NNNNN CCGG-5'	
	<u><i>Sfi</i> IA-Schnittstelle (SMART-IV-Oligonukleotid)</u>	
	5'-GGCC ATTAC GGCC-3'	
	3'-CCGG TAATG CCGG-5'	
	<u><i>Sfi</i> IB-Schnittstelle (CDSIII/3'-PCR-Primer)</u>	
	5'-GGCC GCCTC GGCC-3'	
	3'-CCGG CGGAG CCGG-5'	
B	<i>Arabidopsis thaliana:</i>	460 000 bp
	<i>Mus Musculus:</i>	23 000 bp
	<i>Escherichia coli</i>	150 000 bp
	<i>Saccharomyces cerevisiae:</i>	170 000 bp

Abb. 16: **A:** Allgemeine und die spezifischen Erkennungssequenzen *Sfi* IA und *Sfi* IB für das Restriktionsenzym *Sfi* I. Es ist jeweils angegeben, mit welchem Oligonukleotid die Schnittstelle bei der Erststrangsynthese durch das SMART-System in die cDNA eingeführt wird. **B:** Schnittstellenabstände von *Sfi* I in den Genomen einiger Organismen (NEB Catalog, 06/2004).

Die synthetisierte cDNA wurde nach der LD-PCR mit *Sfi* I geschnitten, um kompatible Enden für die Ligation mit einem Vektor zu erzeugen. Wesentlich dabei ist, dass die Erkennungssequenz für *Sfi* I in der DNA vieler Organismen nur äußerst selten vorkommt (siehe Abb. 16). Somit wurden durch die Restriktion nur Teile der cDNA-Endsequenzen (CDS- Primer und SMART-Oligo) abgeschnitten, nicht aber die cDNAs selbst. Die cDNA-Erststrangsynthese wurde, wie unter **2.11.14** und im Herstellerprotokoll beschrieben, durchgeführt. Für die LD-PCR-Amplifikation wurden 27 Zyklen verwendet.

2.11.19.3 Fraktionierung der cDNA nach der Größe

Aus der unter **2.11.19.2** durchgeführten LD-PCR wurde ein Gemisch von cDNA-Fragmenten erhalten. Alle Fragmente <1000 bp waren für die in dieser Arbeit benötigten cDNA-Bank ungeeignet. Es wurde versucht, diese Fragmente weitgehend abzutrennen. Dazu wurden zunächst 12 µg der bei **2.11.19.2** erhaltenen cDNA auf ein 1 %-Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte solange, bis alle Banden des DNA-Markers (1 kb, MBI) deutlich voneinander getrennt waren. Anschließend wurde die gesamte cDNA oberhalb der 1000 bp-

Marke aus dem Gel ausgeschnitten. Durch Gelextraktion wurde die cDNA aus der Agarose zurückgewonnen. Die gesamte cDNA wurde anschließend nochmals auf ein 1 %-Agarosegel aufgetragen, danach wurde die Fraktionierung wie beschrieben wiederholt. Anschließend wurden die Elutionsansätze vereinigt und das Volumen mit H₂O bidest auf 500 µl eingestellt. Der gesamte Ansatz wurde dann mit einer Microcon YM-100-Mikrozentrifugationssäule auf ein Endvolumen von 25 µl eingeeengt.

2.11.19.4 *Sfi* I-Restriktion der cDNA

Um die *Sfi* IA- und *Sfi* IB-Schnittstellen bei der unter **2.11.19.3** erhaltenen cDNA zu erzeugen, wurde sie mit *Sfi* I geschnitten, dazu wurde folgender Ansatz verwendet:

cDNA (c = 26 ng/µl)	19 µl
<i>Sfi</i> I-Puffer (10 x, NEB)	5 µl
H ₂ O bidest	24,5 µl
<i>Sfi</i> I (20 U/µl)	<u>1,5 µl</u>
	50 µl

Die Inkubation erfolgte bei 50° C für 3 h. Anschließend wurde die cDNA mittels Zentrifugation über eine Silikamembran-Säule aus dem Restriktionsansatz reisoliert.

2.11.19.5 Konstruktion des Hefeexpressionsvektors pDR196SFI

Grundlage der Konstruktion von pDR196SFI war der Hefe-Expressionsvektor pDR196. Dieser wurde freundlicherweise von Dr. Daniel Wipf (IZMB, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt. und enthält den Promotor einer Plasmamembran-ATPase (PMA) sowie den Terminator der Alkohol-Dehydrogenase (ADH) aus Hefe. Weiter enthält der Vektor ein Ampicillinresistenzgen und das zur Synthese von Uracil dienende Gen *URA3*. Der im „Creator SMART cDNA Library Construction Kit“ enthaltene Vektor pDNR-LIB enthielt die zur Konstruktion von pDR196SFI benötigten Restriktionsschnittstellen *Sfi* IA und *Sfi* IB. Um die unter **2.11.19.4** erhaltene cDNA in pDR196 ligieren zu können, mussten diese in pDR196 eingeführt werden. Zu diesem Zweck wurde zunächst der bereits lineare Vektor pDNR-LIB mit dem ebenfalls im Kit enthaltenen Kontrollinsert (cDNA der humanen Fruktose-1,6-bisphosphate aldolase A, ca. 1450 bp) ligiert. Die Reaktion wurde wie folgt angesetzt:

pDNR-LIB (c= 100 ng/µl)	1 µl
Kontrollinsert (c= 50 ng/µl)	1,5 µl
T4-Ligase-Puffer (10 x, NEB)	0,5 µl
H ₂ O bidest	1,5 µl
T4-Ligase (400 U/µl, NEB)	<u>0,5 µl</u>
	5 µl

Der Ansatz wurde bei 16° C über Nacht inkubiert und dann durch Zugabe von 20 µl H₂O bidest verdünnt. Mit 2 µl dieser Verdünnung (ca. 10 ng DNA) wurden chemisch kompetente

E. coli transfiziert. Mit einem Klon dieser Transfektion wurde eine Übernachtskultur angesetzt und daraus der Vektor durch Plasmidpräparation isoliert. Der nun geschlossene Vektor pDNR-LIB enthielt in der MCS das über die Schnittstellen *Sfi* IA und *Sfi* IB eingesetzte Kontrollinsert. Diese beiden Schnittstellen wurden von den Schnittstellen der Restriktionsenzyme *Eco* RI und *Xho* I flankiert. Das Kontrollinsert wurde über diese beiden äußeren Schnittstellen wieder aus dem Vektor herausgelöst (siehe Abb. 17). Dazu wurde folgender Ansatz verwendet:

pDNR-LIB (c= 200 ng/μl)	10 μl
Puffer0 ⁺ (MBI, 10 x)	5 μl
<i>Xho</i> I (MBI, 10 U/μl)	1 μl
<i>Eco</i> RI (MBI, 10 U/μl)	1 μl
H ₂ O bidest	<u>33 μl</u>
	50 μl

Der Ansatz wurde bei 37° C für 1,5 h inkubiert. Anschließend wurde das Kontrollinsert mittels Gelextraktion aus dem Restriktionsansatz zurückgewonnen.



Abb. 17: Lage des Kontrollinserts im Vektor pDNR-LIB. Angegeben die zur Ligation bzw. zum Heraustrennen des Inserts verwendeten Restriktionsenzyme.

Das erhaltene Insert enthielt die beiden *Sfi* I-Schnittstellen (*Sfi* IA und *Sfi* IB) und konnte in den Vektor pDR196 ligiert werden. Dazu wurde dieser zunächst mit *Eco* RI und *Xho* I nach folgendem Ansatz verdaut:

pDR196 (c= 50 ng/μl)	10 μl
Puffer0 ⁺ (MBI, 10x)	5 μl
<i>Xho</i> I (MBI, 10 U/μl)	1 μl
<i>Eco</i> RI (MBI, 10 U/μl)	1 μl
H ₂ O bidest	<u>33 μl</u>
	50 μl

Der Ansatz wurde bei 37° C für 1 h inkubiert und der linearisierte Vektor anschließend durch Gelextraktion aus dem Restriktionsansatz zurückgewonnen. Danach wurden pDR196 und das die *Sfi* I-Schnittstellen enthaltene Insert miteinander ligiert. Der daraus entstehende Vektor wird im folgenden pDR196SFI genannt (siehe Abb. 18). Die Ligation wurde wie folgt angesetzt:

pDR196 (c= 10 ng/μl)	11 μl
Kontrollinsert (c= 10 ng/μl)	5 μl
T4-Ligase-Puffer (10 x, NEB)	2 μl
T4-Ligase (400 U/μl, NEB)	<u>2 μl</u>
	20 μl

Der Ansatz wurde bei 16° C über Nacht inkubiert und dann mit 80 μl H₂O bidest verdünnt. Mit 2 μl dieser Verdünnung (ca. 3 ng DNA) wurde ein Aliquot chemisch kompetente *E. coli* transfiziert. Anschließend wurde mit zwei Klonen (pHM61-2 und pHM61-3) eine Übernachtskultur angesetzt und daraus der Vektor mittels Plasmidpräparation isoliert.

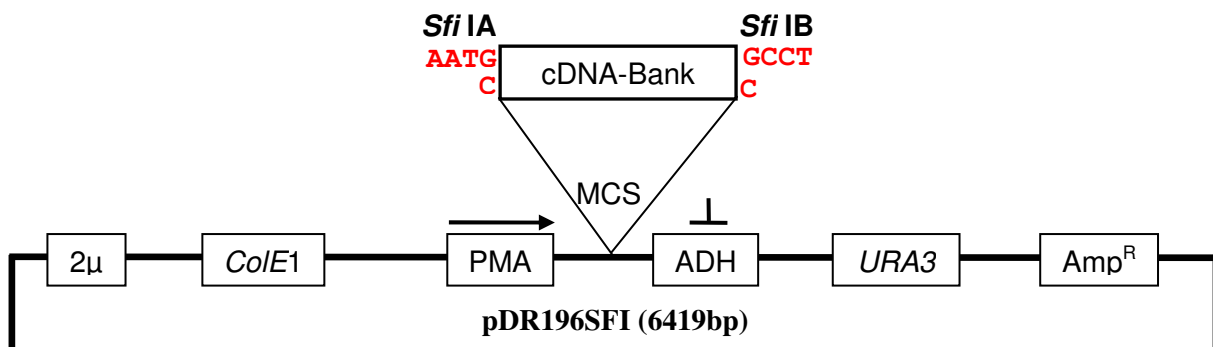


Abb. 18: Hefeexpressionsvektor pDR196SFI. Dargestellt ist die Lage folgender DNA-Sequenzen im Vektor: Hefe-Origin (2μ), *E. coli*-Origin (*colE1*), Promotor (PMA), Terminator (ADH), das für die Uracil Synthese notwendige Gen (*URA3*) und das Ampicillinresistenzgen (*Amp^R*). In die MCS wurden später über die Restriktionsschnittstellen *Sfi* IA und *Sfi* IB die cDNAs aus *Geosiphon* kloniert.

Der neue Vektor pDR196SFI enthielt nun die Schnittstellen *Sfi* IA und *Sfi* IB und konnte mittels *Sfi* I geschnitten werden. Der Restriktionsansatz war wie folgt:

pDR196SFI (c= 226 ng/μl)	98 μl
<i>Sfi</i> I-Puffer (10 x, NEB)	12 μl
H ₂ O bidest	5 μl
<i>Sfi</i> I (20 U/μl)	<u>5 μl</u>
	120 μl

Die Inkubation erfolgte für 3 h bei 50° C. Anschließend wurde der linearisierte Vektor mittels Gelextraktion aus dem Restriktionsansatz zurückgewonnen.

2.11.19.6 Ligation von pDR196SFI mit der *Geosiphon*-cDNA

Die *Sfi* I-geschnittene, größenfraktionierte cDNA aus 2.11.19.4 wurde in den unter 2.11.19.5 vorbereiteten Vektor pDR196SFI ligiert. Die Mengenverhältnisse von cDNA (die Durchschnittsgröße der cDNA wurde nach Agarosegelanalyse der LD-PCR-Produkte von Schritt 2.11.19.3 auf 1300 bp geschätzt) und Vektor (6419 bp) wurden so gewählt, dass ein Molekülnzahlverhältnis von etwa 1:1 entstand. Die Ligation wurde wie folgt angesetzt:

pDR196SFI (c= 42 ng/μl, entspricht 2,5 μg DNA)	60 μl
cDNA (c= 10 ng/μl, entspricht 0,45 μg DNA)	45 μl
T4-Ligase-Puffer (10 x, NEB)	13 μl
T4-Ligase (400 U/μl, NEB)	<u>12 μl</u>
	130 μl

Der gesamte Ansatz wurde bei 16° C über Nacht inkubiert. Nach Abschluss der Ligation wurde die DNA mittels Gelextraktion gereinigt.

2.11.19.7 Transfektion von *E. coli* mit dem Ligationsprodukt pDR196SFI::cDNA

Mit dem unter 2.11.19.6 erhaltenen Ligationsprodukt aus *Geosiphon*-cDNA und Hefeexpressionsvektor pDR196SFI wurden chemisch kompetente *E. coli* (XL10 Gold, Kompetenz: $>10^9$ cfu/μg, Stratagene, La Jolla, U.S.A) transfiziert. Die Zellen wurden in 140 μl-Aliquots geliefert. Zur Transfektion wurde ein solches Aliquot vorsichtig in zwei 1,5 ml-Eppendorfgefäße zu je 70 μl aliquotiert. Zu jedem Aliquot wurden 2,8 μl β-Mercaptoethanol zugegeben. Nach dem Mischen durch vorsichtiges Rühren mit der Pipettenspitze, wurde der Ansatz 10 min auf Eis inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde alle drei Minuten mit einer Pipettenspitze umgerührt. Pro Aliquot wurden dann 2 μl (40 ng) der Plasmid-DNA zugegeben. Die gesamte Transfektion fand, abweichend vom Herstellerprotokoll, im 1,5ml-Eppendorfgefäß statt. Der Hitzeschock dauerte 45 s und wurde im Heizblock durchgeführt. Pro Ansatz wurden 630 μl auf 42° C vorgewärmtes NZY⁺ zugegeben, anschließend folgte für zwei Minuten eine Inkubation auf Eis. Insgesamt wurden 34 Aliquots (je 70 μl Zellen) mit insgesamt 1,36 μg des Ligationsproduktes transformiert. Nach der Transfektion wurden die Ansätze im Schüttelschrank waagrecht für 1 h bei 235 rpm und 37° C inkubiert. Das gesamte Volumen je eines Transfektionsansatzes (700 μl) wurde auf je eine auf 37° C vorgewärmte LB-Ampicillin-Agarplatte (Ø 14 cm) ausplattiert und für 20 Stunden bei 37° C inkubiert.

2.11.19.8 Transfektionseffizienz

Zunächst wurde die Gesamtzahl der Klone aus der Transfektion unter 2.11.19.7 ermittelt. Dazu wurden auf vier verschiedenen Platten auf je 1 cm² die Kolonien gezählt. Daraus wurde die durchschnittliche Kolonienanzahl pro cm² berechnet. Aus diesem Ergebnis und der gesamten Fläche aller Platten wurde die Gesamtzahl der erhaltenen Kolonien berechnet. Die Transfektionseffizienz wurde aus der Anzahl aller Kolonien und der Gesamtmenge der transfizierten Plasmid-DNA berechnet.

2.11.19.9 Durchschnittliche Größe der Plasmidinserts

Durch eine colony-PCR mit den Primern PMA5 und ADHclose wurden die Plasmidinserts von 20 zufällig ausgewählten Klonen aus Schritt 2.11.19.8 amplifiziert. Die PCR-Produkte

wurden mit einem 1 %-Agarosegel analysiert, anhand der Banden wurde die durchschnittliche Insertgröße als arithmetisches Mittel aus der Summe der Größe aller Inserts errechnet. Wurde bei einem Ansatz kein PCR-Produkt erhalten, so wurde davon ausgegangen, dass das Plasmid dieses Klonen kein Insert enthielt. Der prozentuale Anteil von Klonen mit Plasmidinsert an der Gesamtzahl wird als Rekombinanz der Bank bezeichnet.

2.11.19.10 Abernten der Primärbank

Die unter **2.11.19.7** erhaltenen Klone (Primärbank) wurden von den Platten abgeerntet und miteinander vermischt. Dazu wurden zunächst auf eine Kulturplatte 2 ml LB-Medium aufgetragen. Dann wurden die gewachsenen Kolonien mit einem sterilen Trigalskispatel von der Agaroberfläche gelöst. Anschließend wurde die Platte leicht gekippt, dann konnte die entstandene Zellsuspension mit einer Pipette in ein 50 ml Falconröhrchen auf Eis überführt werden. Danach wurden nochmals 2 ml LB-Medium auf die Platte gegeben und die Agaroberfläche nochmals mit dem Trigalskispatel abgewischt. Die so entstandene Zellsuspension wurde dann auf die nächste abzuerntende Platte überführt. Mit dieser Suspension wurde die Platte, nach demselben Verfahren wie bei der ersten Platte abgeerntet. Nach diesem Muster wurden alle Platten der Transfektion abgeerntet. Das Endvolumen der Primärbank lag bei 50 ml und wurde zu je 750 µl aliquotiert, jedes Aliquot wurde mit 750 µl Glycerin (100 %) vermischt und bei -80 °C gelagert.

2.11.19.11 Titerbestimmung der Primärbank

Für die spätere Amplifikation und Plasmidpräparation wurde der Titer der unter **2.11.19.10** erhaltenen Primärbank bestimmt. Dazu wurden verschiedene, verdünnte Aliquots der Primärbank auf LB-Ampicillin-Agar ausplattiert. Durch die Titerbestimmung sollte ermittelt werden, mit welcher Verdünnung der dichteste Einzelkoloniebewuchs einer Platte erzielt werden kann. Zur Erstellung einer Verdünnungsreihe wurden 10 µl der Primärbank in 990 µl LB-Medium verdünnt und gut gemischt. Aus dieser Mischung wurden, durch entsprechendes Übertragen von 10 µl Aliquots in jeweils 990 µl frisches LB-Medium, folgende Verdünnungen hergestellt: 1 : 10²; 1 : 10⁴; 1 : 10⁶; 1 : 10⁸ und 1 : 10¹⁰. Von jeder Verdünnung wurden jeweils 100 µl auf LB-Ampicillin-Agarplatten (Ø 9 cm) plattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das zu dieser Titerbestimmung verwendete Dauerkulturaliquot wurde bis zum Ergebnis der Titerbestimmung bei RT gelagert.

2.11.19.12 Amplifikation der Primärbank

Zur Amplifikation der Primärbank wurde ein Teil des unter **2.11.19.11** zwischengelagerten Primärbankaliquots verdünnt und auf LB-Agar plattiert. Es wurde die Verdünnung gewählt, welche unter **2.11.19.11** den dichtesten Einzelkoloniebewuchs ergab. Insgesamt wurden 5 ml einer solchen Verdünnung hergestellt und je 250 µl davon auf insgesamt 20 LB-

Ampicillin-Agarplatten (Ø 14 cm) ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37° C inkubiert. Insgesamt sollte die so hergestellte Sekundärbank ca. 10⁵ Klone enthalten

2.11.19.13 Abernten der Sekundärbank und Plasmidpräparation

Das Abernten der unter **2.11.19.12** erhaltenen Sekundärbank erfolgte wie bei **2.11.19.10** beschrieben. Die daraus erhaltene Zellsuspension wurde auf zwei 50 ml Falconröhrchen aufgeteilt und für 15 min mit 5000 g bei 4° C zentrifugiert. Die Pellets konnten direkt weiterverarbeitet oder bei -20° C gelagert werden. Zur Plasmidpräparation wurde das „QIAGEN Plasmid Midi Kit“ (Qiagen, Hilden) verwendet. Dazu wurden die Bakterienpellets zunächst auf vier Ansätze aufgeteilt. Die Präparation, wurde bis auf die folgenden Abweichungen, nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt: Die Zentrifugation der DNA-Isopropanolfällung und der anschließenden Ethanolwaschung der DNA-Pellets wurde für 60 min mit 5000 g bei 4° C durchgeführt. Die Resuspension der DNA erfolgte je Ansatz mit 200 µl H₂O bidest. Die so erhaltene Plasmid-cDNA Bank wurde in 1,5 ml-Eppendorfgefäßen zu je 100 µl aliquotiert und bei -80° C gelagert.

2.11.20 Funktionelle Komplementation der Hefemutante EBY VW4000

Um aus *Geosiphon pyriformis* das Gen eines Zuckertransportproteins zu isolieren, wurde ein Protokoll zur funktionellen Komplementation etabliert. Die verwendete Hefemutante EBY VW4000 und der entsprechende Wildtyp EBY CT, wurden freundlicherweise von Dr. Eckhard Boles (Universität Frankfurt, Frankfurt am Main) zur Verfügung gestellt. Diese Hefemutante ist aufgrund von 20 verschiedenen Mutationen in den Genen für Zuckertransportproteine (siehe Tabelle 4) nicht in der Lage Hexosen aufzunehmen. Durch eine weitere Mutation im Gen *URA3* kann diese Mutante den RNA-Baustein Uracil nicht synthetisieren. Wie in **2.11.19** beschrieben wurde eine Plasmid-cDNA-Bank aus *Geosiphon pyriformis* in dem Hefeexpressionsvektor pDR196SFI angelegt. Dieser Vektor enthält den zur Expression des Inserts in Hefe notwendigen Promotor und Terminator, sowie das Gen *URA3*. Durch Transfektion von EBY VW4000 mit den Plasmiden aus der *Geosiphon*-cDNA-Bank wurde versucht die Mutationen zu komplementieren. Die Transfektion wurde nach der so genannten „Lithiumacetat ss-Carrier-DNA PEG“ Methode (Gietz and Woods, 2002) durchgeführt. Auf einem entsprechenden Selektivmedium wurde zunächst nach Klonen gescreent; welche durch Aufnahme eines Vektors auf uracilfreiem Medium wachsen konnten. Durch eine weitere Selektion auf Medium mit Glukose wurde nach Klonen gescreent welche durch die cDNA-Transfektion die Fähigkeit zur Hexoseaufnahme wiedererlangt hatten. Das Wachstum von EBY VW4000 auf dem Disaccharid Maltose wird durch die Mutationen nicht beeinträchtigt.

Tabelle 4: In der Hefemutante EBY VW4000 ausgeschaltete Gene. Sind die in der Tabelle aufgeführten Gene ausgeschaltet, so ist die Hexose-Aufnahme komplett blockiert (Wieczorke et al., 1999).

Abkürzung	Gen	Substrat
hxt1-4	Hefe Hexosetransporter Familie	Hexosen
hxt6	Hefe Hexosetransporter Familie	Hexosen
hxt7	Hefe Hexosetransporter Familie	Hexosen
hxt5	Hefe Hexosetransporter Familie	Noch nicht funktionell charakterisiert
hxt8-11	Hefe Hexosetransporter Familie	Noch nicht funktionell charakterisiert
hxt12	Hefe Hexosetransporter Familie	Putatives Pseudogen
hxt13-17	Hefe Hexosetransporter Familie	Noch nicht funktionell charakterisiert
gal2	Hefe Hexosetransporter Familie	Hexosen
yd1247w	Hefe Maltosetransporter Familie	Noch nicht funktionell charakterisiert
yjr160c	Hefe Maltosetransporter Familie	Noch nicht funktionell charakterisiert
agt1	Hefe Maltosetransporter Familie	Noch nicht funktionell charakterisiert

2.11.20.1 Wachstumstests zur Untersuchung der Selektionsbedingungen für EBY VW4000

Zu Beginn der Arbeit mit EBY VW4000 war nicht bekannt, welche Zuckerkonzentration für das spätere Screening nach positiven Klonen benötigte wurde. Zunächst wurde entschieden die Selektion mit Glukose vorzunehmen. Es wurde vermutet, dass bei zu hoher Glukosekonzentration auch nichtkomplementierte Mutanten wachsen könnten. Dies würde zu einer erheblichen Anzahl falschpositiver Klone führen. Eine zu geringe Konzentration würde aber auch das Wachstum positiver Klone verhindern. Für die Wachstumstests wurden EBY VW4000 und der entsprechende Wildtyp EBY CT parallel auf SD-Agarplatten (Ø14 cm) mit verschiedenen Glukose- und Maltosekonzentrationen plattiert. Zusätzlich wurde den SD-Medien noch Uracil zugesetzt: Sterilfiltrierte Stocklösung 2mg/ml, Endkonzentration 20 mg/l. Folgende Konzentrationen wurden getestet:

Maltosekonzentrationen:

0,012 mM; 0,12 mM; 1,2 mM; 5,8 mM; 1,7 mM

Glukosekonzentrationen:

0,022 mM; 0,22 mM; 2,2 mM; 1,1 mM; 22,2 mM; 88,8 mM; 133,2 mM; 177,6 mM

Auf je einer Hälfte einer Platte wurde der Wildtyp EBY CT, auf der anderen Hälfte die Defektmutante EBY VW4000 plattiert. Die Platten wurden bei 29° C inkubiert und das Koloniewachstum täglich beobachtet.

2.11.20.2 Vorbereitung von EBY VW4000 zur Transfektion

Zur Anzucht wurde EBY VW4000 zunächst aus einer Dauerkultur auf YPM-Agar ausplattiert, die Platten wurden bei 29° C für 2-3 Tage inkubiert. Wenn ausreichend große Kolonien gewachsen waren, wurden eine Start- und danach eine Hauptkultur angelegt. Für die Startkultur wurden 10 ml YPM-Flüssigmedium in einem 500 ml-Erlenmeyerkolben mit einer EBY VW4000-Einzelkolonie angeimpft. Der Kolben wurde mit Aluminiumfolie verschlossen und bei 29° C und 150 rpm über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte

der Kultur bei $\lambda = 600 \text{ nm}$ (OD_{600}) gemessen. Idealerweise lag der Wert bei 1,2, war der Wert zu niedrig, so wurde die Kultur für 1 h weiterinkubiert und die OD_{600} erneut gemessen. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt bis der vorgegebene OD_{600} -Wert erreicht war. Mit der Vorkultur wurde die Hauptkultur angeimpft. Dazu wurden zunächst 200 ml YPM-Flüssigmedium in einen 500 ml-Erlenmeyerkolben mit „Schikane“ vorgelegt. Anschließend wurde die komplette Vorkultur in den „Schikanekolben“ dekantiert. Eine folgende OD_{600} -Messung der angeimpften Hauptkultur sollte 0,15 ergeben. Der Kolben wurde mit einer Aluminiumkappe verschlossen und bei 29°C und 100 rpm für 5 h inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde die OD_{600} erneut gemessen, der Wert sollte zwischen 0,4 und 0,7 liegen. Lag der Wert noch nicht in diesem Bereich, so wurde die Kultur nochmals für 1 h weiterinkubiert und die OD_{600} erneut gemessen. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis der OD_{600} -Wert im vorgegebenen Bereich lag. Zum Abernten der Hauptkultur wurden die 200 ml Kulturvolumen gleichmäßig auf vier 50 ml-Falconröhrchen verteilt und für 15 min mit 3000 g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets mit jeweils 10 ml H_2O bidest resuspendiert und durch Dekantieren in einem 50 ml-Falconröhrchen vereinigt. Dieses wurde für 15 min mit 3000 g bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das erhaltene Pellet wurde in 1 ml Wasser resuspendiert und zu 100 μl in 1,5 ml-Eppendorfgefäße aliquotiert.

2.11.20.3 Ansetzen des „Transfektionsmixes“

Angegeben ist jeweils die zur Transfektion eines 100 μl Hefe Aliquotes notwendige Menge an „Transfektionsmix“. Zur Kontrolltransfektion (Negativkontrolle) wurde der Vektor pDR196SFI-K (pDR196SFI mit Kontrollinsert, siehe **2.11.19.5**) verwendet.

cDNA-Transfektion

PEG (50 %)	240 μl
Lithiumacetat (1 M)	36 μl
Carrier-DNA (2 mg/ml)	50 μl
cDNA (Plasmidpräparation, $c = 1,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)	2 μl
H_2O bidest	<u>32 μl</u>
	360 μl

Kontroll-Transfektion

PEG (50 %)	240 μl
Lithiumacetat (1 M)	36 μl
Carrier DNA (2 mg/ml)	50 μl
pDR196SFI-K	6,5 μl
H_2O bidest	<u>27,5 μl</u>
	360 μl

2.11.20.4 EBY VW4000-Transfektion und erste Selektion der Transformanten

Zur Transfektion wurden zunächst die unter **2.8.20.2** aliquotierten Hefen für 1 min mit 11 000 g bei 4° C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Von den erhaltenen, pelletierten Aliquots wurden 10 Aliquots in je 360 µl des cDNA-Transfektionsmix resuspendiert und ein Aliquot in 360 µl des Kontroll-Transfektionsmix resuspendiert. Anschließend wurden die resuspendierten Aliquots in einem Wasserbad bei 42° C für 40 min inkubiert. Alle 10 min wurde der Inhalt der Reaktionsgefäße durch Invertieren gemischt. Nach der Inkubation wurde zu jedem Ansatz 500 µl H₂O bidest zugegeben. Durch Invertieren wurden die Ansätze gemischt und für 1 min mit 11 000 g bei 4° C zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Die Pellets der Ansätze wurden dann in je 250 µl H₂O bidest resuspendiert und auf je eine SD-Agarplatte mit 2 % Maltose (Ø14 cm) plattiert. Die Platten wurden bei 29° C inkubiert und das Koloniewachstum täglich beobachtet. Vier bis sieben Tage nach dem Plattieren sollten Kolonien von ca. 1-3 mm Durchmesser zu sehen sein. Alle Klone die nach dieser ersten Selektion auf uracilfreiem Medium gewachsen waren, wurden erfolgreich mit einem Vektor transformiert. Diese erste Selektion diente gleichzeitig als Positivkontrolle da auch bei der Kontrolltransfektion Kolonien wachsen sollten.

2.11.20.5 Zweite Selektion der Transformanten

Die unter **2.11.20.4** erhaltenen Klone wurden abgeerntet, miteinander gemischt und in Form einer Glycerin-Dauerkultur gelagert. Ein Teil dieser „transformierten Hefebank“ wurde zur zweiten Selektion der Klone ausplattiert. Zuvor wurden die Transfektionseffizienzen für cDNA- und Kontroll-Transfektion bestimmt. Dabei wurde wie unter **2.11.19.8** beschrieben vorgegangen. Der Wert für eine erfolgreiche Hefetransfektion liegt etwa bei 10⁵ Kolonien/µg DNA. Um die Hefebank der cDNA-Transfektion abzuernsten wurde H₂O bidest verwendet, ansonsten wurde dabei wie unter **2.11.19.10** beschrieben vorgegangen. Anschließend wurde das Falconröhrchen 15 min mit 3000 g bei 4° C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurden 50 ml steriles H₂O bidest zugegeben und das Pellet durch Invertieren resuspendiert. Der Waschschrift wurde zweimal wiederholt, zum Schluss wurde steriles H₂O bidest bis zu einem Gesamtvolumen von 20 ml zugegeben und das Pellet durch Invertieren resuspendiert. Von der Suspension wurden je 250 µl auf insgesamt 20 SD-Agarplatten (Ø14 cm) mit 22 mM Glukose plattiert. Die Platte der Kontroll-Transfektion wurde gleich wie die der cDNA-Transfektion abgeerntet. Das Waschen des erhaltenen Pellets wurde jedoch mit folgenden H₂O-Mengen durchgeführt: Waschschrift: je 5 ml steriles H₂O bidest; Resuspendieren nach dem letzten Waschschrift: Zugabe von sterilem H₂O bidest bis zu einem Gesamtvolumen von 2 ml. Von der Suspension wurden 250 µl auf eine SD-Agarplatte (Ø14 cm) mit 22 mM Glukose plattiert. Anschließend wurden alle Platten bei 29° C inkubiert und das Koloniewachstum täglich beobachtet. Vier bis sieben Tage nach dem Plattieren sollten Kolonien von ca. 1-3 mm Durchmesser zu sehen sein. Nach der

zweiten Selektion auf Medium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle gewachsene Klone haben durch die cDNA-Transfektion die Fähigkeit zur Glukoseaufnahme wiedererlangt. Bei der Kontrolle sollten keine Kolonien wachsen. Vom Rest der Hefezellsuspensionen von cDNA- und Kontrolltransfektion wurden Glycerin-Dauerkulturen angelegt. Dazu wurden je 850 µl-Aliquots der Zellsuspensionen mit 150 µl Glycerin (100 %) vermischt und bei -80°C gelagert.

2.11.20.6 Replattierung der Klone aus der zweiten Selektion

Aus den bei der zweiten Selektion unter **2.8.20.5** gewachsenen Klonen wurden einige per Zufall ausgewählt und auf Platten mit frischem Selektivmedium replattiert. Dadurch sollte überprüft werden, ob das Wachstum der Klone unter Selektivbedingungen reproduzierbar war. Dazu wurde zunächst je eine Kolonie in 100 µl sterilem H₂O bidest suspendiert. Ein Teil der Suspension wurde dann auf eine SD-Agarplatte (Ø 9 cm) mit 22 mM Glukose plattiert. Die Platten wurden dann bei 29°C inkubiert. Nach vier bis sieben Tagen sollten Kolonien von etwa 1 mm Durchmesser zu sehen sein.

2.11.20.7 Colony-PCR mit Kolonien aus der Replattierung der zweiten Selektion

Aus den bei der Replattierung unter **2.11.20.6** gewachsenen Klonen wurden einige zufällig ausgewählt und das Plasmidinsert per colony-PCR untersucht. Dazu wurden die pDR196SFI-spezifischen Primer PMA5 und ADHclose verwendet. Als Template wurde je eine Kolonie in 5 µl sterilem H₂O bidest resuspendiert. 1,5 µl dieser Suspension wurden für folgenden PCR Ansatz verwendet:

H ₂ O bidest	19,3 µl
Taq-Puffer Y (10 x, Peqlab)	3 µl
dNTPs (2 mM)	3 µl
Primer (je 10 µM)	1,5 µl+1,5 µl
Template (resuspendierte Kolonie)	1,5 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	<u>0,2 µl</u>
	30 µl

Zur Amplifikation wurde folgendes PCR Programm verwendet:

Vordenaturieren:

94° C 7,5 min

50 Wiederholungen:

94° C 30 s

50° C 30 s

72° C 5 min

Nachamplifikation:

72° C 15 min

Die PCR-Produkte wurden mit einem 1,2 % Agarosegel analysiert und anschließend unter Verwendung der Primer ADHclose und PMA5 sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mittels BLAST-Analyse untersucht.

2.11.20.8 Plasmidpräparation aus Hefe und Retransfektion in *E. coli*

Plasmide in Hefeklonen haben für die weitere Arbeit mit den DNA-Sequenzen einige Nachteile. Zum einen wächst die Hefekultur unter Selektivbedingungen nur langsam, zum anderen sind die Ausbeuten von Plasmidpräparationen aus Hefeflüssigkulturen nur gering. Daher wurden Plasmide von Interesse aus Hefe isoliert und damit anschließend kompetente *E. coli* transfiziert. Für die dazu verwendete Hefe-Flüssigkultur wurden zunächst 10 ml SD-Medium mit 22 mM Glukose in ein Glasreagenzröhrchen (1,5 cm Durchmesser, 18 cm Länge) vorgelegt. Danach wurde eine Kolonie des entsprechenden Klones in 5 µl H₂O bidest suspendiert, mit 1 µl dieser Suspension wurde das SD-Medium angeimpft. Die Kulturröhrchen wurden mit Aluminiumkappen verschlossen und bei 29° C und 185 rpm für zwei bis drei Tage inkubiert. Wenn die Kultur gut gewachsen war, wurde die Plasmidpräparation durchgeführt. Dazu wurden zunächst säuregewaschene Glaskugeln präpariert: 20 ml Glaskugeln (Ø 0,5 mm) wurden in einem 150 ml Becherglas mit HNO₃ (65 %) überschichtet und bei RT für 10 min inkubiert. Anschließend wurde die Säure abgegossen, die Kugeln 10 mal mit je 100 ml H₂O bidest gewaschen, im Wärmeschrank getrocknet und abschließend bei 121° C für 20 min autoklaviert. Zur Plasmidpräparation wurden aus einer gut gewachsenen SD-Flüssigkultur 1,5 ml entnommen, in ein frisches 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt und dieses für 5 min mit 3000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Zu dem Pellet wurden dann 0,3 ml der säuregewaschenen Glaskugeln, 0,2 ml der Hefe-Minilösung, und 0,2 ml Phenol Chloroform Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben. Diese Mischung wurde für zwei Minuten mit einem Vortex-Homogenisator gemischt und anschließend für 3 min mit 11 000 g zentrifugiert. Danach wurde die obere, wässrige Phase abgenommen, in ein frisches 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt und 1:1 mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) gemischt. Anschließend wurde wieder 3 min mit 11 000 g zentrifugiert. Dann wurde die obere, wässrige Phase abgenommen, in ein frisches 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt und 1:1 mit eiskaltem Isopropanol gemischt. Die Mischung wurde für 20 min bei RT inkubiert und anschließend für 15 min mit 11 000 g bei 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Danach wurden 500 µl Ethanol (70 %) zum DNA-Pellet zugegeben und das Reaktionsgefäß für 3 min mit 11 000 g bei 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Um das DNA-Pellet zu trocknen wurde das Eppendorfgefäß mit offenem Deckel im Wärmeschrank für 15 min bei 37° C gelagert. Anschließend wurde die DNA in 20 µl sterilem H₂O bidest gelöst. Mit 2 µl dieser DNA wurde ein Aliquot chemisch kompetenter *E. coli* Zellen transfiziert. Die Plasmidinserts gewachsener Klone wurden per colony-PCR mit den Primern PMA5 und ADHclose analysiert. Im Anschluss wurden

Übernachtskulturen angesetzt und die daraus mittels Plasmidpräparation gewonnenen Plasmide unter Verwendung der Primer PMA5 und ADHclose sequenziert.

2.11.20.9 Glycerin-Dauerkulturen von EBY VW4000-Klonen

Zur dauerhaften Lagerung eines Klon bzw. des darin enthaltenen Plasmids wurden Hefe-Dauerkulturen angelegt. Dazu wurden 850 µl einer Hefe-Flüssigkultur (siehe 2.11.20.8) des entsprechenden Klon mit 150 µl autoklaviertem Glycerin (100 %) gemischt und bei -80 °C gelagert.

2.11.20.10 Vollängen-Sequenzierung des putativen Hexosetransporters *Gphxt1*

Durch Teilsequenzierung der unter 2.11.20.7 erhaltenen PCR-Produkte wurde die Teilsequenz des putativen Hexosetransporters *Gphxt1* aus *Geosiphon pyriformis* identifiziert. Um die volle Länge der cDNA zu erhalten, wurden mehrere Sequenzierungen durchgeführt. Dazu wurde von der jeweils vorhergehenden Teilsequenz ein Primer zur Sequenzierung des folgenden Teilstücks abgeleitet. Die zur Sequenzierung von *Gphxt1* verwendeten Primer sind in Tabelle 5 aufgeführt. Die Lage der Sequenzierprimer in der cDNA-Sequenz von *hxt1* ist in Abb. 19 dargestellt.

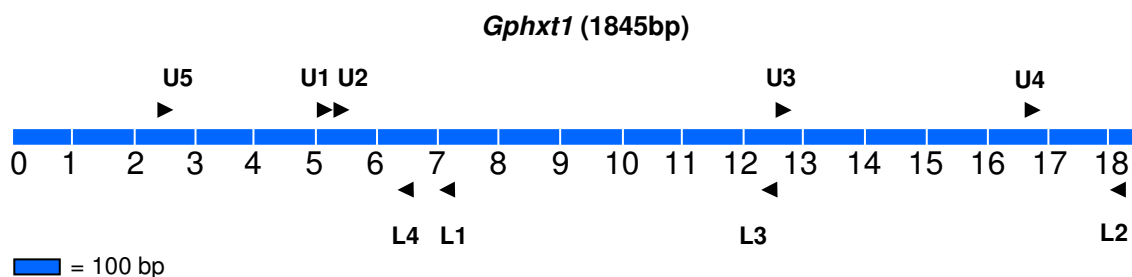


Abb. 19: Lage der zur Sequenzierung von *Gphxt1* verwendeten Primer in der cDNA-Sequenz.

2.11.20.17 Phylogenetische Analyse von GpHXT1p

Um die phylogenetische Stellung einer aus *Gphxt1* abgeleiteten Aminosäuresequenz (GpHXT1p) zu klären, wurden zunächst mittels BLASTP und psiBLAST (position specific iterated initiated BLAST) die nächsten verwandten Sequenzen identifiziert. Die 130 besten „Hits“ wurden mit der AS-Sequenz von GpHXT1p aligned. Aus dem Grad der Ähnlichkeiten der Sequenzen zueinander wurden phylogenetische Stammbäume erstellt. Die Berechnung der Verwandtschaftsbeziehungen unter den Sequenzen wurde durch das PC-Programm Tree Puzzle (<http://www.tree-puzzle.de/>) mit einer maximum-likelihood Methode erstellt.

2.11.21 Physiologische und molekulare Charakterisierung des putativen Zuckertransporters GpHXT1p von *Geosiphon pyriformis*

Ziel der folgenden Experimente war es, den putativen Hexosetransporter GpHXT1p aus *Geosiphon pyriformis* auf physiologischer und molekularer Ebene zu charakterisieren. Dadurch sollten Informationen über Substratspezifität, Transportmechanismus und

Aufnahmekinetik bzw. Regulation der Expression von *Gphxt1* im Licht bzw. im Dunkeln gewonnen werden.

2.11.21.1 Untersuchung der Substratspezifität von GpHXT1p durch Wachstumstests

Die Substratspezifität von GpHXT1p sollte untersucht werden. Dazu wurden Wachstumstests mit dem EBY VW4000-Klon HMY13-S12 (pDR196SFI::*Gphxt1*-transformiert) durchgeführt. Der Stamm wurde auf Agarmedien mit verschiedenen Zuckern bzw. Zuckerderivaten als jeweils einziger Kohlenstoffquelle plattiert. Zunächst wurde HMY13-S12 auf SD-Agarmedien mit folgenden Substraten in jeweils 22 mM Konzentration plattiert: Hexosen: D-Fruktose, L-Fukose, D-Glukose, L-Glukose, D-Galaktose, D-Mannose, L-Rhamnose; Pentosen: D-Arabinose, L-Arabinose, D-Ribose, D-Xylose; Disaccharide: D-Lactose, D/L-Maltose, D-Saccharose, D-Trehalose; Zuckerderivate: N-Acetyl-Glucosamin, myo-Inositol. Anschließend wurden die Platten bei 29°C inkubiert und das Koloniewachstum täglich beobachtet.

In einem weiteren Wachstumstest wurde HMY13-S12 auf SD-Agarplatten mit folgenden Substraten in jeweils 22 mM Konzentration plattiert: D/L-Maltose, D-Mannose, D-Glukose, D-Galaktose, und D-Fruktose. Als Negativkontrolle wurde auf jede der Platten, parallel zu HMY13-S12, der mit dem Vektor pDR196SFI-K (pDR196SFI mit Kontrollinsert, siehe **2.11.19.5**) transfizierte EBY VW4000-Klon HMY14-1 plattiert. Anschließend wurden die Platten bei 29°C inkubiert und das Koloniewachstum täglich beobachtet.

Zuletzt wurde mit HMY13-S12 ein Wachstumstest in SD-Flüssigmedien mit verschiedenen Zuckern in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Daniel Wipf (IZMB, Universität Bonn) durchgeführt. Zunächst wurde mit HMY13-S12 eine Vorkultur angelegt. Dazu wurden 10 ml SD-Flüssigmedium mit 22 mM Glukose in ein Glasreagenzöhrchen (Ø 1,5 cm, Länge 8 cm) vorgelegt und mit einer Einzelkolonie angeimpft. Das Kulturröhrchen wurde mit einer Aluminiumkappe verschlossen und bei 29° C und 185 rpm für 2-3 Tage inkubiert. Von der gewachsenen Flüssigkultur wurden 4 ml auf zwei 2 ml-Eppendorfgefäße verteilt und für 2 min mit 3000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Pellets wurden in jeweils 1 ml H₂O bidest resuspendiert und die Suspensionen dann in einem der beiden Eppendorfgefäße vereinigt. Anschließend wurde für 2 min mit 3000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml H₂O bidest resuspendiert. Von einem Aliquot dieser Suspension wurde eine 1:10 Verdünnung hergestellt und damit eine OD₆₀₀-Messung durchgeführt. Anhand des Messergebnisses wurde die Suspension dann auf eine (rechnerische) OD₆₀₀ von 0,4 verdünnt. Anschließend wurde in die benötigten Wells einer 96er-Mikrotiterplatte jeweils 100 µl der verdünnten Hefezellsuspension vorgelegt. Danach wurde zu den wells jeweils 100 µl 2 x SD-Medium zugegeben. Dieses enthielt jeweils einen der zu testenden Zucker, die verwendeten Endkonzentrationen sind in Tabelle 6 angegeben.

Tabelle 5: Übersicht über die Zucker-Endkonzentrationen in den SD-Flüssigmedien für die Wachstumstests mit HMY13-S12.

Zucker	Konzentrationen (mM)										
D-Mannose	0	2,5	5	10	15	20	25	50	-	-	-
D-Glukose	0	1	2,5	5	10	15	20	50	-	-	-
D-Galaktose	0	2,5	5	10	15	20	25	50	-	-	-
D-Fruktose	0	2,5	5	10	15	20	25	50	100	150	200

Anschließend wurde die Platte auf einem kombinierten Schüttler-OD₆₀₀-Messgerät (Spectra Fluor Plus, Tecan) bei 28 °C und 185 rpm für 14 h inkubiert. Während der Inkubation wurden alle 15 min die OD₆₀₀-Werte in den Wells gemessen und in einen Rechner übertragen. Die Auswertung erfolgte mit der zum Messgerät gehörenden Software „Magellan3“.

2.11.21.2 Untersuchung zum Einfluss von Licht auf die Expression von *Gphxt1*

Mit den folgenden Experimenten sollte überprüft werden, ob *Gphxt1* in *Geosiphon* im Licht stärker als im Dunkeln exprimiert wird. Dazu wurde mit der unter 2.11.18 synthetisierten „solid Phase cDNA“ und dem *Gphxt1*-spezifischen Primerpaar Y13-U2/Y13-L3 eine PCR durchgeführt. Zur Identifikation von Template-Konzentrationsunterschieden welche nicht auf regulierte Expression zurückzuführen sind, wurde eine weitere PCR durchgeführt. Dazu wurden Primer für den in *Geosiphon pyriformis* putativ konstitutiv exprimierten Elongationsfaktor *EF-1α* verwendet (EF1-UC/EF1LC). Als DNA-Polymerase wurde die „Phusion High Fidelity DNA-Polymerase“ verwendet. Die PCR mit einem Primerpaar wurde wie folgt angesetzt: Jede der sieben „solid-Phase-cDNA“ Proben wurde zunächst in einem Magnethalter pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Jeder der Ansätze wurde anschließend in folgendem Master-Mix resuspendiert:

Phusion Master Mix (2 x)	25 µl
Primer (10 µM)	2,5 µl+2,5 µl
H ₂ O bidest	<u>22,5 µl</u>
	50 µl

Bei der Amplifikation der „solid-Phase-cDNA“ wurde wie unter 2.11.18.4 vorgegangen, zur Voramplifikation wurde folgendes Programm verwendet:

Vordenaturieren:

98° C 3 min

Vier Wiederholungen:

98° C 10 s

59° C 30 s

72° C 45 s

Abschließendes Denaturieren:

94° C 2 min

Die voramplifizierten Reaktionsansätze wurden wie folgt weiteramplifiziert:

Vordenaturieren:

98° C	3 min
-------	-------

14-29 Wiederholungen:

98° C	10 s
-------	------

59° C	30 s
-------	------

72° C	30 s
-------	------

Nachamplifikation:

72° C	10 min
-------	--------

Nach 15 Zyklen wurde das Programm unterbrochen und aus jedem Reaktionsgefäß eine 10 µl-Probe entnommen. Danach wurden mit den Proben fünf weitere PCR-Zyklen durchgeführt und erneut aus jedem Ansatz eine 10 µl-Probe entnommen. Nach diesem Muster wurden insgesamt 30 Zyklen durchgeführt. Abschließend wurden die entnommenen Proben auf einem 1 %-Agarosegel analysiert. Die Unterschiede in der Helligkeitsintensität der Banden wurden mit der Software „ImageJ“ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) gemessen und in Form eines Blockdiagramms dargestellt.

2.11.21.3 pH-Messungen in Hefesuspensionen zur Untersuchung des Transportmechanismus von GpHXT1p

Um den Transportmechanismus von GpHXT1p zu untersuchen, wurden pH-Messungen mit dem EBY VW4000-Klon HMY13-S12 (pDR196SFI::*Gphxt1*-transformiert) durchgeführt. Der mit pDR196SFI-K (pDR196SFI mit Kontrollinsert, siehe **2.11.19.5**) transformierte EBY VW4000-Klon HMY14-1 wurde für Kontrollmessungen verwendet. Es wurde untersucht, ob die Zugabe von verschiedenen Zuckern zu einer wässrigen Hefezellsuspension den pH des Mediums alkalischer macht. Dies wäre ein Hinweis auf einen protonengetriebenen Einwärtstransport von Zucker in die Zellen. Zunächst wurden von beiden Klonen Vorkulturen in Glasreagenzöhrchen (Ø 1,5 cm, Länge 8 cm) mit 10 ml SD-Medium und 1 % Maltose angelegt. Die Vorkulturen wurden mit je einer Einzelkolonie der auf YPM angezogenen Klone angeimpft, mit Aluminiumkappen verschlossen und bei 29° C und 185 rpm über Nacht inkubiert. Für die Hauptkultur von HMY13-S12 wurden 75 ml SD-Flüssigmedium mit 0,1 % D-Glukose, für HMY14-1 75 ml SD-Flüssigmedium mit 0,1 % Maltose in je einen 500 ml-„Schikanekolben“ vorgelegt. Nach dem Animpfen der Kulturen mit jeweils der gesamten Vorkultur des entsprechenden Klons wurden die Kolben mit einer Aluminiumkappe verschlossen und bei 29° C und 170 rpm über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation wurde die OD₆₀₀ der Kulturen gemessen. Anschließend wurden die Kulturen in je ein 50 ml Falconröhrchen überführt und für 10 min mit 400 g bei 4° C zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets in je 50 ml sterilem H₂O bidest resuspendiert. Danach wurde 10 min mit 400 g bei 4° C zentrifugiert und die Überstände verworfen. Anschließend wurden die Pellets mit sterilem H₂O bidest resuspendiert, so dass eine Suspension mit einer

(rechnerischen) OD_{600} von 15 erhalten wurde. Die Suspension wurde in ein 15 ml-Falconröhrchen überführt und mit einem Magnetrührstäbchen versehen. Das Falconröhrchen wurde dann in einer Halterung über dem Magnetrührer fixiert. Nach dem Eintauchen der pH-Elektrode wurde die Messung gestartet. Dabei wurden die Messwerte des pH-Meters in einen Rechner übertragen und gespeichert. Bei den Messungen wurde stets gerührt und wie folgt vorgegangen: Nach Eintauchen der pH-Elektrode wurde zunächst der pH-Wert für 15 min aufgezeichnet ohne dass Substrate zugegeben wurden. Danach wurden 50 μ l einer 20 %igen Lösung des jeweils zu testenden Substrats zugegeben (Endkonzentration ca. 0,2 %) und die pH-Messung für weitere 15 min aufgezeichnet. Bei einigen Messungen wurden dann nochmals 50 μ l einer weiteren Substratlösung zugegeben, die pH-Messung für weitere 15 min aufgezeichnet. Nach dem Ende einer solchen Messreihe wurde die Suspension für 2 min mit 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 12 ml H_2O bidest resuspendiert. Danach wurde für 2 min mit 400 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Abschließend wurde das Pellet in der gleichen Menge H_2O bidest wie zu Beginn der Messung resuspendiert. Mit dieser Suspension wurde die nächste Messung durchgeführt. Eine Übersicht über alle pH-Messungen mit beiden Klonen und den getesteten Substraten ist in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 6: Übersicht über die pH-Messungen mit den Hefeklonen HMY13-S12 und HMY14-1.

No.	Hefeklon	Substrate	Dauer der pH-Aufzeichnung
1	HMY13-S12	H_2O bidest	15 min
		D-Glukose	15 min
2	HMY13-S12	H_2O bidest	15 min
		D-Mannose	15 min
3	HMY13-S12	H_2O bidest	15 min
		L-Glukose	15 min
		D-Glukose	15 min
4	HMY13-S12	H_2O bidest	15 min
		L-Rhamnose	15 min
		D-Glukose	15 min
5	HMY13-S12	H_2O bidest	15 min
		D-Arabinose	15 min
6	HMY13-S12	H_2O bidest	15 min
		H_2O bidest	15 min
7	HMY13-S12	H_2O bidest	15 min
		D/L-Maltose	15 min
8	HMY14-1	H_2O bidest	15 min
		D/L-Maltose	15 min
9	HMY14-1	H_2O bidest	15 min
		D-Glukose	15 min
10	HMY14-1	H_2O bidest	15 min
		H_2O bidest	15 min
		D/L-Maltose	15 min

2.11.21.4 Membranpotentialmessungen in *Xenopus*-Oozyten zur Untersuchung des Transport-mechanismus von GpHXT1p

Der putative Hexosetransporter GpHXT1p transportiert möglicherweise entsprechende Substrate über die symbiotische Membran von *Geosiphon pyriformis* in den Pilz. Der Cotransport von Protonen entlang eines bestehenden Gradienten könnte dabei als Energiequelle dienen. Die so genannte erleichterte Diffusion kommt ebenfalls als Transport-mechanismus für GpHXT1p in Betracht. Zur Untersuchung des Transportmechanismus von GpHXT1p wurde eine heterologe Expression von *Gphxt1* in unbefruchteten Eizellen des Südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* versucht. Dieses eukaryotische Expressionssystem wird vielfach für die heterologe Expression von Proteinen verwendet. In die Oozyten eingebrachte mRNA eines Transmembran-Proteins wird translatiert, prozessiert und das Protein anschließend funktionsfähig in die Zellmembran eingebaut (Miller et al., 1994). Das Innere einer lebenden Oozyte mit intakter Zellmembran ist gegenüber dem Außenmedium negativ geladen. Der Einwärtstransport von Protonen in eine Zelle bewirkt, sofern das Substrat ungeladen ist, eine Depolarisation dieses Membranpotentials. Eine protonengekoppelte Substrataufnahme in eine solche Zelle ist somit als Potentialänderung messbar. Um diese Untersuchungen durchzuführen, musste zunächst ein geeigneter Vektor hergestellt und *Gphxt1* kloniert werden. Dieser Vektor wurde dann als Template zur *Gphxt1*-cRNA-Synthese verwendet. Diese cRNA konnte direkt in die zu messenden Oozyten injiziert werden.

2.11.21.4.1 Konstruktion des Oozyten-Expressionsvektors pOO2SFI

Für die heterologe Expression von *Gphxt1* in *Xenopus*-Oozyten wurde zunächst der Oozyten-Expressionsvektor pOO2SFI konstruiert. Grundlage war der Oozyten-Expressionsvektor pOO2, welcher freundlicherweise von Dr. Uwe Ludewig (Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt wurde. Dieser Vektor enthält Elemente welche zur Herstellung einer in Oozyten funktionellen cRNA notwendig sind. Dies ist zunächst ein SP6-Promotor, von diesem aus kann eine RNA-Polymerase die Transkription der folgenden DNA-Sequenzen beginnen. Die MCS von pOO2 wird von den nichttranslatierten Bereichen (untranslated regions, UTRs) des β -Globin-Gens von *Xenopus laevis* flankiert (Liman et al., 1992). Als weiteres Element folgt der MCS eine polyA-Sequenz von ca. 20 bp Länge. Unmittelbar hinter dem polyA folgt eine Restriktionsschnittstelle für *Mlu* I. Da der Vektor pOO2 die zur Ligation mit *Gphxt1* notwendigen Schnittstellen *Sfi* IA und *Sfi* IB nicht enthielt, mussten diese in den Vektor eingefügt werden. Die Schnittstellen wurden aus dem mit einem Kontrollinsert geschlossenen Vektor pDNR-LIB (siehe 2.11.19.5) herausgetrennt und in pOO2 eingesetzt. Dazu wurden zunächst pOO2 und pDNR-LIB mit *Xho* I und *Eco* RI geschnitten. Es wurden folgende Ansätze verwendet:

pOO2 (c=70 ng/μl)	10 μl
Puffer0 ⁺ (MBI, 10 x)	3 μl
<i>Xho</i> I (MBI, 10 U/μl)	1 μl
<i>Eco</i> RI (MBI, 10 U/μl)	1 μl
H ₂ O bidest	<u>20 μl</u>
	50 μl

pDNR-LIB (c= 200 ng/μl)	10 μl
Puffer0 ⁺ (MBI, 10 x)	5 μl
<i>Xho</i> I (MBI, 10 U/μl)	1 μl
<i>Eco</i> RI (MBI, 10 U/μl)	1 μl
H ₂ O bidest	<u>33 μl</u>
	50 μl

Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 1,5 h. Anschließend wurden pOO2 und das Kontrollinsert durch Gelextraktion aus dem jeweiligen Restriktionsansatz zurückgewonnen und über die *Xho* I- und *Eco* RI-Schnittstellen miteinander ligiert. Der daraus entstehende Vektor wird im folgenden pOO2SFI genannt (siehe Abb. 20). Für die Ligation wurde folgender Ansatz verwendet:

Kontrollinsert (c= 3 ng/μl)	15 μl
pOO2 (c= 9 ng/μl)	10 μl
T4-Ligase-Puffer (NEB, 10 x)	3 μl
T4-Ligase (NEB, 400 U/μl)	<u>2 μl</u>
	30 μl

Der Ansatz wurde bei RT für 15 min inkubiert. Mit 5 μl des Ligationsansatzes (ca. 22 ng DNA) wurde ein Aliquot chemisch kompetente *E. coli* transfiziert.

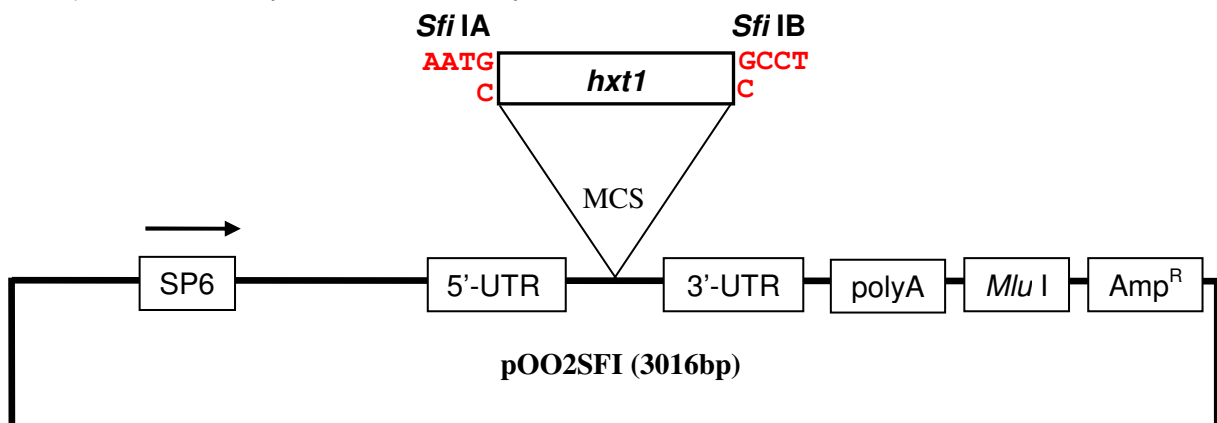


Abb. 20: Oozyten-Expressionsvektor pOO2SFI. Dargestellt sind folgenden DNA-Sequenzen im Vektor: SP6-Promotor zur *in vitro* cRNA-Synthese, 5'-, und 3'- untranslatierte Bereiche (5'-UTR und 3'-UTR), des β -Globin-Gens von *Xenopus laevis*, polyA-Abschnitt, *Mlu* I-Schnittstelle zur Vektorlinearisierung und das Ampicillinresistenzgen (Amp^R). Die MCS diente zur Ligation der *Gphxt1*-cDNA in den Vektor und enthält die Restriktionsschnittstellen *Sfi* IA und *Sfi* IB.

Mit der Übernachtskultur eines Klon dieser Transfektion wurde eine Plasmidpräparation durchgeführt. Der daraus gewonnene Vektor pOO2SFI enthielt nun die Schnittstellen *Sfi* IA und *Sfi* IB. Über diese Schnittstellen wurde das Kontrollinsert wieder aus dem Vektor herausgetrennt. Dazu wurde folgender Restriktionsansatz verwendet:

pOO2SFI (c= 33 ng/μl)	25 μl
<i>Sfi</i> I-Puffer (10 x, NEB)	4 μl
H ₂ O bidest	10 μl
<i>Sfi</i> I (20 U/μl)	<u>1 μl</u>
	120 μl

Die Inkubation erfolgte für 3 h bei 50° C, anschließend wurde der Vektor über eine Gelextraktion aus dem Restriktionsansatz zurückgewonnen.

2.11.21.4.2 Klonierung von *Gphxt1* in pOO2SFI

Die cDNA von *Gphxt1* lag zunächst noch im Hefeexpressionsvektor pDR196SFI in *E.coli*-TOP10 kloniert vor (siehe 2.11.20.9). Von einer Übernachtskultur des entsprechenden Klones (HM91-1) wurde eine Plasmidpräparation durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde danach mit folgendem Ansatz geschnitten:

pHM91-1 (c= 592 ng/μl)	2 μl
<i>Sfi</i> I-Puffer (10 x, NEB)	5 μl
H ₂ O bidest	42 μl
<i>Sfi</i> I (20 U/μl)	<u>1 μl</u>
	50 μl

Die Inkubation erfolgte für 3 h bei 50° C. Anschließend wurde das cDNA-Insert (*Gphxt1*) über eine Gelextraktion aus dem Restriktionsansatz zurückgewonnen. Die *Gphxt1*-cDNA und pOO2SFI (aus 2.11.21.4.1) wurden durch folgenden Ansatz ligiert:

<i>hxt1</i> (c= 5 ng/μl)	10 μl
pOO2SFI (c= 22 ng/μl)	5 μl
T4-Ligase-Puffer (NEB, 10 x)	3 μl
H ₂ O bidest	10 μl
T4-Ligase (NEB, 400 U/μl)	<u>2 μl</u>
	30 μl

Der Ansatz wurde bei RT für 15 min inkubiert. Mit 5 μl des Ligationsansatzes (ca.26 ng DNA) wurden dann chemisch kompetente *E. coli* transfiziert. Mit der Übernachtskultur eines Klon dieser Transfektion (HM96-1) wurde eine Plasmidpräparation durchgeführt. Das Plasmid wurde anschließend mit den Primern SP6 und Y13-U4 sequenziert.

2.11.21.4.3 cRNA-Synthese von *Gphxt1*

Aus dem unter 2.11.21.4.2 erhaltenen Plasmid pHM96-1 (pOO2SFI::*Gphxt1*) wurde cRNA von *hxt1* hergestellt. Dazu wurde das „mMESSAGE mMACHINE Kit (Ambion) verwendet. Dieses produziert mittels der SP6-RNA-Polymerase und allen anderen im Kit enthaltenen notwendigen Komponenten eine cRNA, welche das so genannte „5'-cap“ enthält. Dieses wird in Form eines cap-Analogons (m⁷G(5')ppp(5')G) an das 5'-Ende der mRNA angeheftet. Das „5'-cap“ dient vor allem zur Verbesserung der Stabilität und Translationseffizienz der cRNA in einem eukaryotischen Expressionssystem, wie es die *Xenopus*-Oozyte darstellt. (Krieg et al., 1984, Drummond et al., 1985, Gillian-Daniel et al., 1998). Die SP6-RNA-Polymerase beginnt vom SP6-Promotor des Vektors aus, die stromabwärts gelegene DNA in cRNA zu transkribieren. Diese *in vitro*-Transkription wird fortgesetzt bis das Template zu Ende ist und die Polymerase abfällt. Daher ist es erforderlich, den Vektor unmittelbar hinter der der MCS folgenden polyA-Sequenz durch Restriktion zu linearisieren. In einem kreisförmigen, geschlossenen Vektor würde die Polymerase im Kreis laufen und unbrauchbare cRNA-Transkripte verschiedener Länge liefern. Das Plasmid pHM96-1 wurde mit folgendem Ansatz linearisiert:

pHM96-1 (c= 258 ng/μl)	5 μl
<i>Mlu</i> I-Puffer (10 x, NEB)	5 μl
H ₂ O bidest	35 μl
<i>Mlu</i> I (10 U/μl)	<u>5 μl</u>
	50 μl

Die Inkubation erfolgte bei 37° C für 2 h, anschließend wurde das linearisierte Plasmid durch eine Gelextraktion aus dem Restriktionsansatz zurückgewonnen und direkt als Template für die cRNA-Synthese eingesetzt. Für einen Ansatz wurden 6 μl Plasmid-DNA (450 ng) verwendet, die Synthese wurde nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Anschließend wurde die cRNA auf einem denaturierenden Agarosegel auf Degradation und Größe geprüft. Danach wurde die Konzentration mit dem UV-Spektrometer gemessen und mit RNase-freiem H₂O (aus Kit) auf 1 μg/μl eingestellt.

2.11.21.4.4 Denaturierende Agarosegele zur RNA-Analyse

Um RNA elektrophoretisch aufzutrennen wurden denaturierende Agarosegele verwendet.

Für ein denaturierendes Agarosegel (1,2 %) wurde folgendes angesetzt:

H ₂ O	21 ml
MEA-Laufpuffer (10 x)	2,5 ml
Agarose	0,3 g

Nach dem Aufkochen in der Mikrowelle wird die Mischung auf unter 55° C abgekühlt und 1,25 ml Formaldehyd (37 %) zugegeben. Nach dem Mischen kann das Gel (Gesamtvolumen

25 ml) gegossen werden. Die aufzutrennende RNA wurde mit folgenden Komponenten in einem 0,5 ml-Eppendorfgefäß gemischt:

RNA	1 µl
Ethidiumbromid (5 µg/µl)	1 µl
Ladepuffer (NEB, 2 x)	<u>1 µl</u>
	3 µl

Anschließend wurde die RNA-Probe im PCR-Cycler bei 65° C für 10 min inkubiert, danach sofort auf Eis gestellt und nach ca. 1 min auf das Gel aufgetragen. Danach wurde die RNA mit 80 V Spannung für 1 h aufgetrennt. Als Marker wurde die NEB „RNA ladder“ benutzt, davon wurde 1 µl (entspricht 500 ng RNA) verwendet und wie die RNA-Probe zum Auftragen auf das Gel vorbereitet.

2.11.21.4.5 Präparation von *Xenopus laevis*-Oozyten

Die Oozyten wurden aus jeweils frisch entnommenen Ovarlappen des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* präpariert. Die Ovarlappen wurden freundlicherweise von Dipl. Biol. Henrik von Rosenberg (Technische Universität Darmstadt) zur Verfügung gestellt. Je nach Entwicklungszustand im Ovarium werden die Oozyten in sechs verschiedene Stadien (I-VI) eingeteilt. Diese lassen sich optisch gut voneinander unterscheiden (Hilken et al., 1997). Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden, wie bei Expressionsversuchen mit *Xenopus*-Oozyten üblich, Eizellen der Stadien V und VI verwendet (Miller et al., 1994). Zu erkennen sind diese Entwicklungsstadien an der klaren Trennung zwischen der braun-schwarzen Pigmentierung des animalen Pols sowie der hellgelben Färbung des vegetativen Pols der Zelle (Miller et al., 2000). Zur Oozytenpräparation wurden die Ovarlappen zunächst zu Gruppen von fünf bis zehn Zellen vereinzelt. Dies geschah durch Zerteilen des ovariellen Bindegewebes mit zwei feinen Pinzetten. Daraufhin wurden die in den genannten Entwicklungsstadien befindlichen Zellen aussortiert. Als nächster Schritt wurden die Zellen aus der sie umgebenden Follikelzellschicht herausgelöst. Dazu wurden die Eizellen bei RT für 30 min in ND 96 (Ca²⁺-frei, mit 0,2 % Kollagenase) inkubiert. Um die Kollagenase nach der Inkubation zu entfernen, wurden die Oozyten mit ND 96 (Ca²⁺-frei, 1 mg/ml BSA) fünfmal gewaschen. Danach wurde die Follikelzellschicht mit der Pinzette vorsichtig von den Eizellen abgezogen. War dies nur schwer möglich, so wurden die Zellen bei RT für etwa 30 min in KPP-Puffer inkubiert. Durch diesen Puffer entsteht ein osmotisches Ungleichgewicht zwischen Außen- und Innenmedium der Zelle. Als Folge strömt Wasser aus der Oozyte ins Medium und die Eizelle schrumpft geringfügig. Dadurch wird das Herauslösen aus der Follikelzellschicht erleichtert. Die Entfernung dieser Schicht erleichtert das Eindringen in die Zelle sowohl mit der Mikropipette zur cRNA-Injektion als auch mit den Mikroelektroden zur Potentialmessung. Die Lagerung der zur so cRNA-Injektion vorbereiteten Oozyten erfolgte bei 4° C in ND 96.

2.11.21.4.6 Injektion von *Gphxt1*-cRNA in *Xenopus*-Oozyten

Zu Injektion von *Gphxt1*-cRNA in die unter 2.11.21.4.5 präparierten Oozyten wurden zunächst Mikropipetten mit einem Mikropipettenziehgerät (Narishige) aus vorgefertigten Glaskapillaren (Bores Oocyte Inj 90 mm, Flared, 3-000-204-GIX) mit den Einstellungen 73,6 (Step1) und 54,9 (Step2) gezogen. Da mit dem Ziehgerät nur sehr feine Spitzen ($< 1 \mu\text{m}$) gezogen werden konnten, wurden diese unter dem Mikroskop, unter Zuhilfenahme eines Messokulars und eines Skalpell, vorsichtig abgebrochen. Dabei wurde versucht einen Spitzendurchmesser etwa $15 \mu\text{m}$ zu erhalten. Zur Injektion wurde die cRNA in einer Konzentration von $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingesetzt. Anschließend wurden unter einem Binokular je 50 nl cRNA mit einem Mikrodispensor (Drummond) mittels Glasmikropipette in die Oozyten injiziert (siehe Abb. 21). Für Kontrollexperimente wurde in einige Zellen jeweils 50 nl H_2O injiziert. Die Zellen waren dabei stets vollständig mit ND 96 bedeckt. Zur Expression wurden die Oozyten in 1,5 ml-Eppendorfreaktionsgefäßen in einem kühlbaren Inkubationsblock bei 16°C gehalten. Für Expressionsversuche von cRNA in *Xenopus*-Oozyten werden in der Literatur 4-5 Tage Expressionszeit vor Beginn der Messungen als ausreichend beschrieben (Zhou et al., 1998, Zhou et al., 2000). Diese Zeit wurde auch bei diesem Experiment eingehalten. Insgesamt wurden 50 Oozyten mit cRNA und 25 Zellen mit H_2O injiziert

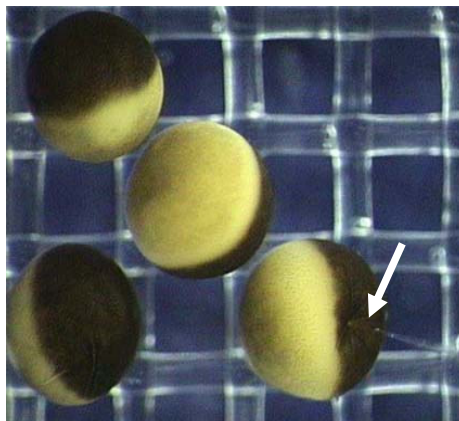


Abb. 21: Präparierte und zur cRNA-Injektion vorbereitete Oozyten von *Xenopus laevis* mit eingestochener Mikropipette (Pfeil). Deutlich sichtbar ist die für die Reifestadien V und VI charakteristische, scharfe Trennung zwischen der braunen Pigmentierung des animalen, sowie der hellgelben Färbung des vegetativen Pols der Zelle (Miller et al., 2000).

2.11.21.4.7 Membranpotentialmessungen mit *Xenopus*-Oozyten

Für die Membranpotentialmessungen wurden die unter 2.11.21.4.6 mit *Gphxt1*-cRNA injizierten *Xenopus*-Oozyten zunächst in ein Messbad (Eigenbau, Werkstätten der Technischen Universität Darmstadt) überführt. Dieses war an mehrere einzeln zuschaltbare Vorratsgefäße angeschlossen und konnte mit dem jeweils gewünschten Puffer durchströmt werden. Somit konnten die Badlösungen jeweils schnell gewechselt werden. Eine Saugpumpe (WISA) hielt das dabei das Niveau des Messbads konstant. Die Messelektroden

wurden mit dem Mikroelektrodenziehgerät (PP-830, Narishige) aus vorgefertigten Glaskapillaren (alte Meterwarebestände der Technischen Universität Darmstadt, Borosilikatglas mit Filament, Außendurchmesser 1 mm) mit den Einstellungen 73,6 (Step1) und 54,9 (Step2) gezogen. Zwei dieser Elektroden wurden mit KCl (3 M) gefüllt, in je einem Mikromanipulator (Narishige, Japan) befestigt und mit dem Messverstärker (Turbo-TEC-03X, NPI Electronic) für die Potentialmessungen verbunden. Eine vereinfachte Schaltskizze des Messverstärkers ist in Abb. 22 dargestellt. Zu Beginn einer Messung wurde zunächst der Widerstand der Elektroden über eine in den Messverstärker integrierte Messschaltung ermittelt. Dieser lag bei allen verwendeten Elektroden im Bereich zwischen 0,5 und 1 M Ω . Danach wurden die Mikroelektroden in die Oozyte eingestochen und mit der Messung begonnen. Die Messwerte wurden vom Messverstärker in einen Rechner übertragen und mittels der Software „Win WCP“ (Strathclyde Whole Cell Programm, Version 3.5.2, John Dempster, Department of Physiology & Pharmacology, Strathclyde Institute for Biomedical Sciences, University of Strathclyde, Glasgow) ausgewertet. Der jeweils folgende Schritt eines Experiments wurde eingeleitet, sobald sich eine Plateaubildung des Membranpotentials abzeichnete. Die einzelnen Schritte werden im Folgenden beschrieben. Zu Beginn eines Experiments befand sich die Oozyte in Puffer pH 7,5. Nachdem das Membranpotential keine größeren Schwankungen mehr zeigte, wurde Puffer pH 5, zunächst ohne Glukose, eingeleitet. Die pH-Absenkung diente dazu, GpHXT1p Protonen als Cosubstrat zur Verfügung zu stellen. Als Nebeneffekt konnte die Integrität der Zellmembran getestet werden. Eine intakte Zelle reagiert, wegen Einwärtsdiffusion von H⁺ (Grignon and Sentenac, 1991), auf den Wechsel von neutralem zu saurem Medium mit einer Erhöhung des Membranpotentials.

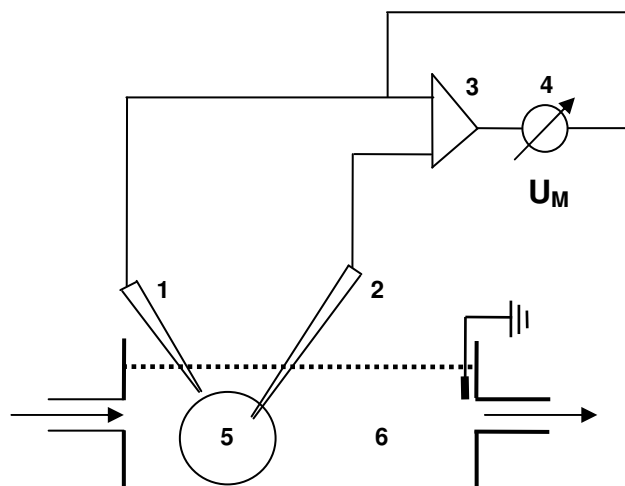


Abb. 22: Vereinfachte Schaltskizze der in dieser Arbeit verwendeten Apparatur zur Membranpotentialmessungen. Diese besteht aus der Messelektrode (1), der Referenzelektrode (2), dem Messverstärker (3) und dem darin integrierten Voltmeter (4). Die Oozyte (5) befindet sich im Messbad (6), welches über einen Zu- und einen Abfluss mit verschiedenen Medien durchströmt wurde.

Als nächster Schritt wurde die Zelle mit Puffer pH 5 mit 50 mM Glukose umströmt. Anschließend wurde wieder Puffer 5 ohne Glukose und abschließend Puffer pH7,5 ins Bad geleitet. Dadurch sollte getestet werden, ob alle beobachteten Veränderungen des Membranpotentials reversibel waren. Die beschriebenen Messungen wurden mit Glukose als vermutetem Substrat von GpHXT1p durchgeführt.

2.11.21.5 Messung der Glukoseaufnahme in *hxt*-transformierte EBY VW4000-Klone

Die Glukoseaufnahme-Experimente wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Daniel Wipf (IZMB, Universität Bonn) durchgeführt um Informationen über Aufnahmekinetik (Michaelis-Menten-Kinetik), Substratspezifität und Transportmechanismus und von GpHXT1p zu erhalten. Dazu wurden die mit *Gphxt1* transformierten EBY VW4000-Klone HMY13-S12, HMY13-S26 und HMY13-617 verwendet. Zur Untersuchung der Aufnahmekinetik wurde gemessen wie sich die Aufnahmeraten für D-Glukose in Gegenwart verschiedener Glukosekonzentrationen im Inkubationsmedium änderten. Bei den Experimenten zu Substratspezifität und Transportmechanismus wurde untersucht wie sich die Aufnahmeraten bei einer konstanten Glukosekonzentration, in Gegenwart verschiedener Testsubstanzen (Hexosen bzw. ATPase-Hemmstoffe und Entkoppler) veränderten. Um zu messen wie viel D-Glukose die Hefen jeweils aufgenommen hatten, war ein Teil davon radioaktiv markiert (spezifische Aktivität: $0,11 \cdot 10^9 \text{ Bq} \cdot \text{mmol}^{-1}$, Amersham, Freiburg). Zur Anzucht der Hefeklone für die Aufnahmemessungen wurden in Glasreagenzöhrchen (\varnothing 1,5 cm, Länge 8 cm) jeweils 10 ml SD-Flüssigmedium mit 22 mM Maltose vorgelegt und mit je einer Einzelkolonie der Klone angeimpft. Das Röhrchen wurde mit einer Aluminiumkappe verschlossen und über Nacht bei 29° C und 185 rpm inkubiert. Bei einer OD_{600} von 0,5 wurden die Kulturen abgeerntet, dieser Wert entspricht einer Zellzahl von $2 \cdot 10^6$ Zellen/100 μl (durch Zellzählung ermittelt). Danach wurden die Kulturen in je ein 10 ml Falconröhrchen überführt und für 10 min mit 3000 g bei 4° C zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml H_2O bidest resuspendiert. Anschließend wurde wieder für 10 min mit 3000 g bei 4° C zentrifugiert und der Überstand verworfen, dieser Waschschrift wurde insgesamt zweimal durchgeführt. Danach wurden die Zellen mit Puffer A (0,6 M Sorbitol und 50 mM K_3PO_4 , pH 6,5) resuspendiert. Das Puffervolumen wurde so gewählt, dass die Suspension einen (rechnerischen) OD_{600} -Wert von 5,0 erhielt. Zur Herstellung eines Messansatzes wurden je 100 μl der Suspension ($2 \cdot 10^6$ Zellen) mit 100 μl Puffer A in einem 1,5 ml Ependorfgefäß gemischt. Der Puffer A enthielt entweder verschiedene Glukosekonzentrationen (Kinetik-Messungen) oder eine konstante Glukosekonzentration und verschiedene Testsubstanzen (Messungen zu Substratspezifität und Transportmechanismus). Nach dem Mischen wurden die Ansätze bei 30° C und 1000 rpm inkubiert. Während der Inkubation wurde nach 0,5; 1; 2 und 4 min je ein 50 μl -Aliquot entnommen.

Dieses wurde mit 4 ml eiskaltem Puffer A gemischt, auf einer Vakuumapparatur (Eigenbau Werkstätten Universität Bonn) durch ein Fiberglasfilter (\varnothing 25 mm, Typ GF/C, Schleicher&Schuell, Dassel) filtriert und zweimal mit 4 ml Puffer A gewaschen. Anschließend wurde das Filter in ein Messgefäß mit 3 ml Szintillationscocktail (Ultima Gold XR, Perkin Elmer) überführt. Die in der Hefe enthaltene Menge an radioaktiver Glukose wurde dann mit einem Szintillationszählgerät (Packard TriCarb, GMI) gemessen. Mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor wurde die insgesamt aufgenommene Glukosemenge berechnet und der Wert auf 10^5 Hefezellen normiert. Die so ermittelten Glukosemengen wurden in einem Diagramm gegen die entsprechende Inkubationszeit aufgetragen. Durch die erhaltenen Messpunkte wurde eine Ausgleichsgerade mit der Formel $m = dm/dt \cdot t + b$ (allgemein: $y = a \cdot x + b$) gelegt. Nach der Formel $V = dm/dt$ kann die Aufnahme rate direkt aus der Geradengleichung abgelesen werden. Alle Aufnahmemessungen wurden mit jedem der drei Klone durchgeführt.

2.11.21.5.1 Untersuchung der Aufnahmekinetik von GpHXT1p

In diesem Experiment wurde die Kinetik des Glukosetransports über GpHXT1p untersucht. Gemessen wurde, wie sich die Aufnahme rate für Glukose in Abhängigkeit der Konzentration ändert (Michaelis-Menten Kinetik). In Tabelle 8 sind die jeweiligen Endkonzentrationen an D-Glukose in einem 200 μ l Messansatz aufgeführt.

Tabelle 7: Übersicht über die Ansätze für die Aufnahmemessungen zur Michaelis-Menten-Kinetik.

Ansatz	D-Glukose gesamt (mM)
1	0,33
2	0,5
3	0,75
4	5
5	10
6	50
7	93,33
8	193,33
10	293,33
11	493,33

Die ermittelten Aufnahme rates (V) wurden in ein Diagramm gegen die entsprechende Konzentrationen (c) aufgetragen. Durch die Messpunkte wurde eine Ausgleichskurve gelegt. Anhand des Diagramms konnten die Werte für die maximalen Aufnahme rate V_{\max} (Sättigung des Transporters) und die Michaelis-Menten Konstante K_M (Substratkonzentration bei $V_{\max}/2$) graphisch ermittelt werden. Parallel dazu wurden die für V und c ermittelten Werte nach Lineweaver-Burk transformiert, in einem weiteren Diagramm wurden die daraus erhaltenen Werte $1/V$ gegen $1/c$ aufgetragen, die Messpunkte wurden mit einer Ausgleichsgeraden nach der allgemeinen Formel: $y = ax + b$ verbunden. Aus der Gleichung der Ausgleichsgeraden

konnten die Werte für K_M und V_{max} rechnerisch nach folgenden Formeln ermittelt werden:
 $V_{max} = 1/b$ und $K_M = a/b$.

2.11.21.5.2 Messungen zur weiteren Untersuchung der Substratspezifität von GpHXT1p

In diesem Experiment wurde nochmals (siehe Wachstumstests unter **2.11.21.1**) die Substratspezifität von GpHXT1p untersucht. Es wurde untersucht wie sich die Aufnahme rate für Glukose über GpHXT1p bei einer jeweils konstanten Glukosekonzentration in Gegenwart der Substratkompetitoren D-Mannose, D-Glukose, D- Galaktose, und D-Fruktose ändert. Die Standardmessung wurde mit 75 mM Glukose, davon waren 3,3 mM radioaktiv markiert, durchgeführt. Zur Messung der Aufnahme rates in Gegenwart eines Kompetitors wurde dieser dem Ansatz Standardmessung im fünffachen Überschuss (375 mM) zugegeben.

2.11.21.5.3 Messungen zur Untersuchung des Transportmechanismus von GpHXT1p

In diesem Experiment wurde nochmals (siehe pH-Messungen unter **2.11.21.3** und Potentialmessungen mit *Xenopus*-Oozyten unter **2.11.21.4**), der Transportmechanismus von GpHXT1p untersucht. Hier wurde gemessen ob und wie sich die Aufnahme rate für Glukose, bei einer jeweils konstanten Glukosekonzentration in Gegenwart verschiedener Hemmstoffe welche indirekt die Funktion von GpHXT1p beeinträchtigen, ändert. Es wurden zwei Arten von Hemmstoffen verwendet:

- 1.) ATPase-Hemmstoffe: Vanadat und DES (Diethyl-Stilbestrol)
- 2.) Entkoppler: CCCP (Carbonylcyanid m-Chlorphenyl Hydrazon) und DNP (2,4 Dinitro-phenol).

Entkoppler zerstören den Protonengradienten, ATPase Hemmstoffe verhindern den Aufbau des Protonengradienten. Wird die Aufnahme rate für die Glukose durch die Zugabe solcher Hemmstoffe reduziert, so ist der Transport über GpHXT1p wahrscheinlich protonengekoppelt. Die Messungen wurden wie unter **2.11.21.5.2** durchgeführt, statt der Kompetitoren wurden die Hemmstoffe in jeweils 0,1 mM Konzentration zugegeben.

3. Ergebnisse

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, in der *Geosiphon*-Symbiose symbiosespezifisch exprimierte Gene zu identifizieren. Von speziellem Interesse waren Gene, deren Proteine dem Makrosymbionten *Geosiphon* die Aufnahme von Zucker ermöglichen. Dieser wird vom photosynthetisch aktiven Mikrosymbionten *Nostoc* in den Raum zwischen seiner Zellmembran und der Symbiosomenmembran abgegeben. Die Aufnahme in *Geosiphon* erfolgt wahrscheinlich über ein Transmembran-Transportsystem. Obwohl die Identifikation und funktionelle Charakterisierung eines Zuckertransporters zum Verständnis der Symbiose beitragen würde, konnte ein solcher bislang noch nicht aus *Geosiphon* isoliert werden. Um die cDNA eines Zuckertransportergens zu isolieren, wurden zwei verschiedene methodische Wege beschritten. Erstens die subtraktive Hybridisierung zweier cDNA Proben mit anschließendem differentielltem Screening. Zweitens der Aufbau einer Hefe-Expressions-cDNA-Bank und anschließende funktionelle Komplementation einer Hefemutante. Im Verlauf der Arbeit wurde dann der gefundene Zuckertransporter GpHXT1p aus *Geosiphon* physiologisch charakterisiert.

3.1 Subtraktive Hybridisierung und differentielltes Screening

Es wurde angenommen, dass die Expression einiger Gene für den Zuckertransport in *Geosiphon* unter Lichteinfluss höher als im Dunkeln ist. Mittels subtraktiver Hybridisierung und anschließendem differentielltem Screening zweier cDNA-Proben aus entsprechend inkubierten *Geosiphon*-Blasen wurde versucht, die cDNA Sequenz eines Zuckertransporters, oder anderer Gene die beim symbiotischen Kohlenstoff-Metabolismus des Pilzes eine Rolle spielen, zu isolieren.

3.1.1 Bestimmung des polyA-RNA-Gehalts von *Geosiphon*-Blasen

Zu Beginn wurde eine Methode etabliert, die es ermöglicht mit magnetischen Partikeln (Dynabeads) aus *Geosiphon* Blasen polyA-RNA zu isolieren. Für die Durchführung weiterer Experimente war es wichtig den polyA-RNA-Gehalt der *Geosiphon* Blasen zu kennen, dieser wurde auf zwei verschiedene Arten ermittelt.

3.1.1.1 Vergleich mit dem polyA-RNA-Gehalt anderer eukaryotischer Zellen

Aus dem Gewicht von 500 isolierten Blasen (ca. 10 mg) und Vergleich mit Literaturangaben über den polyA-RNA-Gehalt eukaryotischer Zellen wurde der polyA-RNA-Gehalt der *Geosiphon*-Blasen geschätzt. Aus solchen Vergleichen ließ sich für *Geosiphon* eine Konzentration von ca. 100 ng polyA-RNA/500 Blasen ableiten. Dies entspricht etwa 0,2 ng polyA-RNA/Blase.

3.1.1.2 Bestimmung durch Fluoreszenzspektrometrie

Der polyA-RNA-Gehalt der *Geosiphon*-Blasen wurde zusätzlich mittels Fluoreszenzspektrometrie bestimmt. Dazu wurde aus 50 Blasen mittels Dynabeads polyA-RNA isoliert. Die polyA-RNA-Konzentration des Isolates wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ribo Green gemessen. Es ergab sich ein Wert von 0,16 ng polyA-RNA/Blase.

3.1.2 Herstellung der cDNA-Proben zur subtraktiven Hybridisierung

Für die Herstellung der cDNA-Proben zur subtraktiven Hybridisierung wurde zunächst je ein Ansatz *Geosiphon*-Blasen für 72 h im Licht bzw. im Dunkeln inkubiert. Aus ca. 600 Blasen pro Ansatz wurden mittels Dynabeads ca. 100 ng polyA-RNA isoliert. Diese wurde anschließend mittels dem „SMART-System“ (Clontech) zu Erststrang-cDNA umgeschrieben. Diese cDNA enthält an beiden Enden kurze, definierte Sequenzen in welchen sich Primerbindestellen sowie die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Rsa* I befinden. Anschließend wurde die Erststrang-cDNA per LD-PCR („long distance PCR“) amplifiziert. Das PCR-Produkt ergab nach der Agarosegelanalyse einen „Schmier“ mit einem Größenbereich von etwa 200 bp bis 2000 bp (Abb. 23). Der „Schmier“ war bei der im Licht inkubierten Probe schwächer als bei der im Dunkeln inkubierten Probe. Der Größenbereich beider Proben ist ähnlich, jedoch fehlen die bei der Dunkel-Probe deutlich sichtbaren Banden zwischen 1500 und 2000 bp. Die erwähnten Unterschiede zwischen beiden Proben konnten in ähnlicher Form bei PCR-Amplifikationen von cDNA-Erststrangprodukten aus polyA-RNA-Isolationen voneinander unabhängig inkubierter Blasen beobachtet werden.

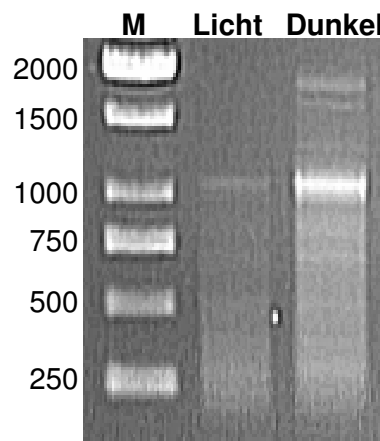


Abb. 23: Agarosegelanalyse des LD-PCR Produkts der SMART cDNA Erststrangamplifikation mit 27 Zyklen (M = Marker, Größe in bp). Es fällt auf, dass die cDNA der im Licht inkubierten Probe im Vergleich zu der im Dunkeln inkubierten Probe einen schwächeren „Schmier“ aufweist. Ebenso fehlen bei der im Licht inkubierten Probe die bei der Dunkelprobe zu erkennenden Banden zwischen 1500 und 2000 bp.

3.1.3 Untersuchung klonierter „SMART-cDNA“

Die Methode polyA-RNA mit Dynabeads aus *Geosiphon* zu isolieren und mit dem „SMART-System“ zu cDNA umzuschreiben, war vor Beginn dieser Arbeit noch nicht angewendet worden. Daher sollte zunächst die Qualität der so erhaltenen „SMART-cDNA“ untersucht werden. Dazu wurde ein Teil der cDNA aus der Dunkelprobe kloniert. Das Plasmidinsert gewachsener Klone wurde per colony-PCR mit dem adaptorspezifischen „SMART 5'-PCR Primer IIA“ amplifiziert. Abb. 24 zeigt das Ergebnis einer solchen colony-PCR. Der Größenbereich der PCR Produkte lag zwischen 250bp und 2000bp. Die Plasmidinserts von insgesamt 56 Klonen wurden anschließend sequenziert. Die durchschnittliche Länge der colony-PCR-Produkte dieser Klone lag bei 950 bp. Von insgesamt 56 Klonen wurden die Plasmid-Inserts bei 46 Klonen durchsequenziert. Bei 10 Klonen wurde eine im Durchschnitt 550 bp lange 5'- Teilsequenzierung durchgeführt.

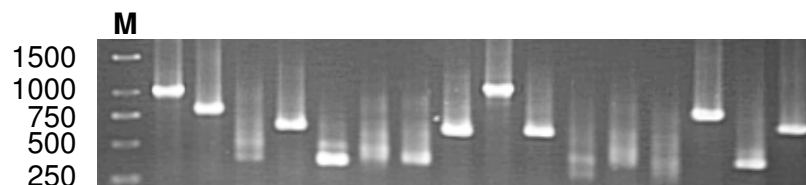


Abb. 24: Agarosegelanalyse von Produkten einer colony-PCR mit Klonen einer SMART-cDNA-Klonierung (M = Marker, Größe in bp). Die Größe der PCR-Produkte liegt in einem Bereich von etwa 250 bis 1000 bp. In späteren colony-PCR Reaktionen mit Klonen aus weiteren cDNA-Synthesen wurden jedoch auch Produkte bis zu einer Größe von ca. 2000 bp erhalten.

Zunächst wurden die Ergebnisse der Vollängen Sequenzierung untersucht. Bei 74 % der Sequenzen konnte ein offenes Leseraster (ORF) von mindestens 50 Aminosäuren (AS) Länge identifiziert werden, die durchschnittliche Länge lag bei 174 AS, die längste bei 418 AS. Ein Startcodon zu Beginn der ORF-Sequenz enthielten 91 % der ermittelten ORFs, bei 85 % der ORFs war dies ein ATG, bei 12 % ein TTG und bei 3 % ein CTG. Bei allen Sequenzen mit vollständigem ORF (Start und Stop) wurde die durchschnittliche Länge der 5'- und 3'-untranslatierten Regionen (UTRs) ermittelt. Für die 5'-UTR ergab sich eine durchschnittliche Länge von 114 bp, für die 3'-UTR wurden 282 bp ermittelt. Alle untersuchten Sequenzen endeten mit einem polyA mit einer Länge von ca. 30 Nukleotiden. Bei ca. 90 % der Sequenzen wurde vor Beginn der polyA-Sequenz das Polyadenylierungssignal (ATTAAA oder AATAAA) gefunden.

Anschließend wurden noch die Ergebnisse der 5'-Teilsequenzierungen untersucht. Bei 80 % der Sequenzen konnte ein ORF mit mindestens 50 AS Länge identifiziert werden, die durchschnittliche Länge betrug 136 AS, die längste 224 AS. Zu Beginn der ORF-Sequenz enthielten 89 % der identifizierten ORFs ein Startcodon, in allen Fällen war dies ein ATG. Für die 5'-UTR aller ORFs mit Startcodon ergab sich eine durchschnittliche Länge von 145 bp. Mittels BLASTX und BLASTP wurde untersucht, ob die erhaltenen Sequenzen Ähnlichkeiten

zu bereits identifizierten Genen bzw. deren Proteinen in online-Sequenzdatenbanken zeigen. Mit den Ergebnissen aus der BLAST-Analyse konnten die klonierten Sequenzen verschiedenen Proteinklassen zugeordnet werden (Abb. 25). Eine detaillierte Auflistung und Annotation befindet sich im Anhang.

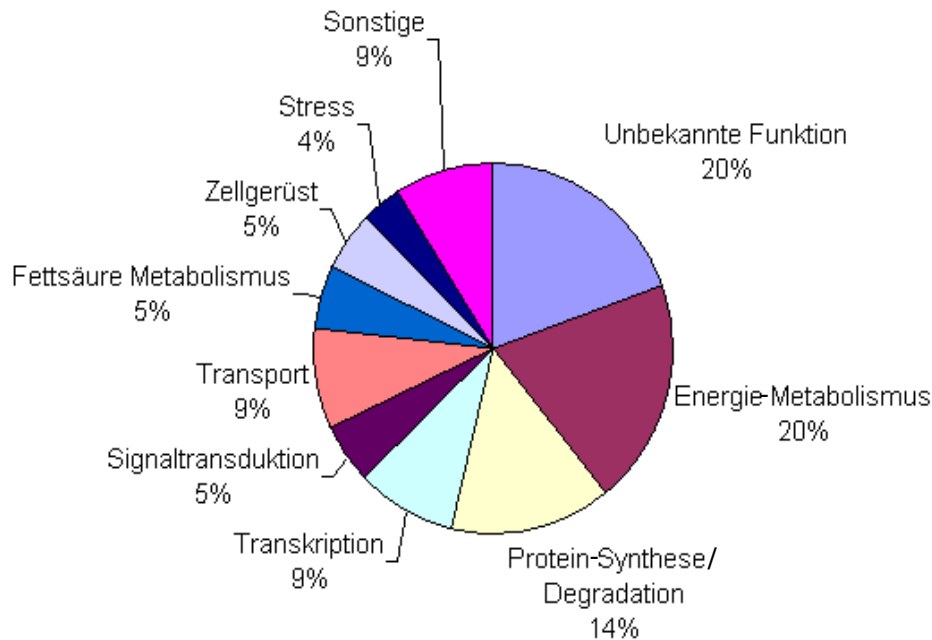


Abb. 25: Analyse klonierter SMART-cDNA Sequenzen aus *Geosiphon*. Insgesamt wurden die Plasmide von 56 Klonen sequenziert und durch BLAST-Homologievergleiche analysiert. Die so erhaltenen Ähnlichkeiten der Sequenzen zu korrespondierenden Proteinen wurden, entsprechend ihres prozentualen Anteils, zu verschiedenen Klassen zusammengefasst.

3.1.4 Subtraktive Hybridisierung der cDNA-Proben

Die cDNA-Proben aus den im Licht bzw. im Dunkeln inkubierten *Geosiphon*-Blasen (siehe 3.1.2) wurden für die im Folgenden beschriebene subtraktive Hybridisierung verwendet. Zunächst wurden beide Proben mit dem Restriktionsenzym *Rsa* I in kleinere Fragmente geschnitten. Anschließend wurden an die 5'-Enden der cDNA aus der *Geosiphon*-Lichtinkubation kurze Oligonukleotide (Adaptoren) ligiert. Die Ligation erfolgte in zwei getrennten Ansätzen mit zwei verschiedenen Adaptoren. Die mit Adaptoren versehene cDNA wird als Tester-cDNA bezeichnet. Die cDNA aus der Dunkelinkubation blieb unverändert und wird als Treiber-cDNA bezeichnet. Bei der anschließenden Subtraktion wurden die beiden Tester-cDNA Ansätze denaturiert und mit denaturierter Treiber-cDNA vermischt. Eine anschließende Absenkung der Temperatur bewirkt die Re-Hybridisierung von komplementären cDNA-Einzelstrangmolekülen zu doppelsträngigen cDNA-Molekülen. Nach Abschluss dieser ersten Hybridisierung wurden die beiden Tester-cDNA Ansätze miteinander vermischt. Zu dieser Mischung wurde erneut denaturierte Treiber-cDNA zugegeben. Wie bereits im vorigen Schritt wurde die Temperatur abgesenkt, dies erlaubte den noch vorhandenen einzelsträngigen cDNA-Molekülen miteinander zu hybridisieren. Als Resultat

der beiden Hybridisierungsschritte bildeten sich verschiedene Typen von cDNA-Hybridmolekülen. Nur die cDNA-Fragmente, welche ausschließlich in der Tester-cDNA vorkamen, bildeten solche Hybriden die an ihren 5'-Enden je einen der beiden Adaptortypen trugen. Allein diese Hybridmoleküle konnten bei der folgenden PCR mit adaptorspezifischen Primern exponentiell amplifiziert werden. Das vorgehend beschriebene Experiment wird im Folgenden als Vorwärtssubtraktion bezeichnet. Als Kontrollexperiment wurde parallel eine so genannte Rückwärtssubtraktion durchgeführt. Der Ablauf war genau wie vorgehend beschrieben, allerdings wurden die cDNA-Proben für Tester- und Treiber-cDNA vertauscht. Dies bedeutet, dass die Adaptern an die *Rsa* I-geschnittene cDNA aus der *Geosiphon*-Dunkelinkubation ligiert wurden. Die cDNA aus der Lichtinkubation blieb in diesem Fall unverändert.

Die Agarosegeleanalyse der cDNA-Restriktion mit *Rsa* I ist in Abb. 26 gezeigt. Nach der Restriktion zeigte der „cDNA-Schmier“ eine im Vergleich zur ungeschnittenen cDNA (Abb. 23, 3.1.2) reduzierte Größe von etwa 150 bis 1500 bp sowie ein verändertes Bandenmuster. Im nächsten Schritt wurde die Adaptorligation an die Tester-cDNA durchgeführt.

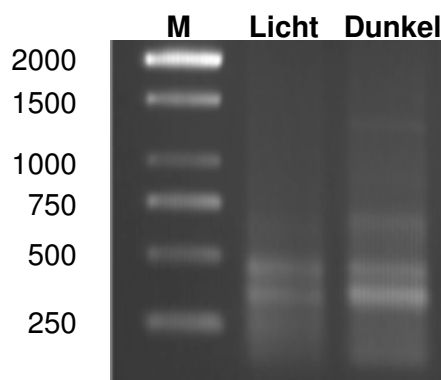


Abb. 26: Agarosegeleanalyse der *Rsa* I-Restriktion der cDNA aus im Licht bzw. im Dunkeln inkubierter Blasen von *Geosiphon*. (M = Marker, Größe in bp). Im Vergleich zur ungeschnittenen cDNA (Abb. 23) wurden durch die Restriktion sowohl der Größenbereich des „cDNA-Schmiers“ als auch dessen Bandenmuster verändert. Die Restriktion war Voraussetzung für die folgende Ligation der Adaptor-Oligonukleotide an die beiden cDNA Proben.

Die Effizienz der Adaptorligation wurde durch PCR untersucht, es wurde eine Kombination aus einem gen- und einem adaptorspezifischen Primer verwendet. Alternativ wurde das entsprechende genspezifische Primerpaar eingesetzt. Wie sich auf der Abbildung der durchgeführten Agarosegeleanalyse (Abb. 27) erkennen lässt, sind die 400 bp großen Produkte der PCR mit Adaptor-Primerpaar größer als die 270 bp großen Produkte der Amplifikation mit genspezifischen Primerpaar. Die 400 bp-Bande des PCR-Produktes mit der Primerkombination ist mindestens halb so stark wie die des 270 bp-Produktes aus der

Amplifikation mit genspezifischen Primern. Dies zeigt, dass die Adaptorligation bei einem großen Teil der cDNA erfolgreich war.

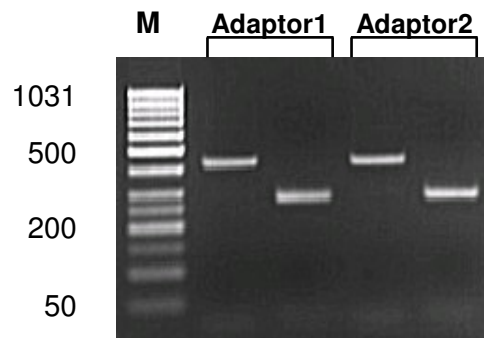


Abb. 27: Agarosegelanalyse der Kontroll-PCR zur Adaptorligation an die mit *Rsa* I geschnittenen *Geosiphon*-cDNA Proben der Vorwärtssubtraktion. Das Ergebnis für die Rückwärtssubtraktion war identisch (M = Marker, Größe in bp). Die Größe der PCR Produkte aus der PCR-Amplifikation unter Verwendung einer Kombination aus gen- und adaptorspezifischen Primern beträgt etwa 400 bp. Die PCR-Amplifikation unter Verwendung genspezifischer Primer ergab Produkte von etwa 270 bp Größe. Vergleicht man die PCR-Produkte miteinander so fällt auf, dass die 400 bp-Banden nur etwa halb so stark wie die 270 bp Banden sind.

Nach den eingangs beschriebenen Hybridisierungsschritten wurden Aliquots der „subtrahierten“ cDNA von Vorwärts- und Rückwärtssubtraktion durch eine PCR mit adaptorspezifischen Primern amplifiziert. Eine nachfolgend durchgeführte Nested-PCR sollte die Spezifität der Amplifikation verbessern. Um zu überprüfen, inwiefern die Subtraktion der cDNA-Proben eine Veränderung im Vergleich zu nicht subtrahierter cDNA bewirkt hatte, wurden so genannte nichtsubtrahierte cDNA-Proben mittels PCR amplifiziert. Zu diesem Zweck wurde zunächst ein Aliquot Tester-cDNA an beiden 5'-Enden mit je einem der beiden verschiedenen Adaptoren ligiert. Ein solcher, unsubtrahierter Kontrollansatz wurde sowohl aus der Tester-cDNA der Vorwärts- als auch von der Rückwärtssubtraktion hergestellt. Anschließend wurden die beiden Kontrollansätze genau wie die subtrahierten cDNA-Proben mittels PCR und Nested-PCR amplifiziert. Die Agarosegelanalyse der PCR-Produkte aus den beiden subtraktiven Hybridisierungen und den Kontrollen ist in Abb. 28 gezeigt.

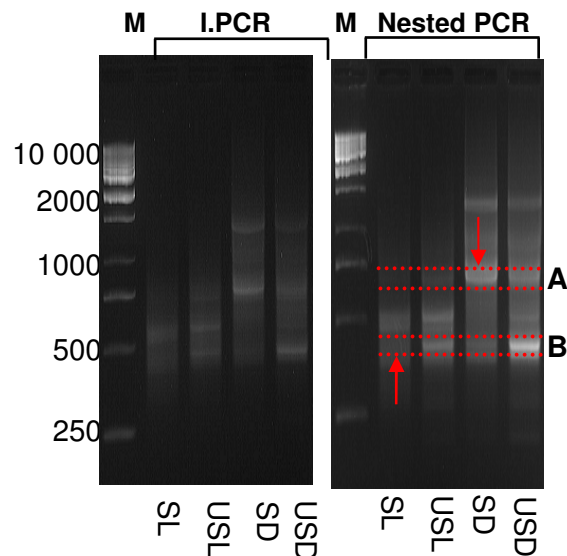


Abb. 28: Agarosegelanalyse von PCR- und Nested-PCR-Amplifikation der subtrahierten und unsubtrahierten cDNA Proben aus *Geosiphon* (M = Marker, Größe in bp; **SD** = subtrahierte cDNA aus Rückwärtssubtraktion, **USD** = unsubtrahierte cDNA aus Rückwärtssubtraktion, **SL** = subtrahierte cDNA aus Vorwärtssubtraktion, **USL** = unsubtrahierte cDNA aus Vorwärtssubtraktion, Größen in bp). Erkennbar sind Unterschiede in den Bandenmustern zwischen Produkten aus der Amplifikation subtrahierter cDNA im Vergleich zu den Produkten aus den unsubtrahierten Kontrollen. Wie sich erkennen lässt, wurden diese Unterschiede durch die Nested-PCR noch etwas verstärkt.

Die PCR-Produkte von Vorwärts- (SL) und Rückwärtssubtraktion (SD) unterscheiden sich im Bandenmuster jeweils von den Produkten der entsprechenden unsubtrahierten Kontrollen (USL bzw. USD). Dieser Unterschied zeigte sich bereits bei den Produkten der ersten PCR und wurde bei der Nested-PCR noch deutlicher sichtbar. Anhand von zwei verschiedenen Banden des Agarosegels der Nested-PCR (Abb. 28, markierte Abschnitte **A** und **B**) können die Ergebnisse der subtraktiven Hybridisierung veranschaulicht werden.

Abschnitt A: Die cDNA-Bande welche nur in der unsubtrahierten Probe USD, nicht aber bei USL zu sehen ist, erscheint verstärkt bei der Probe SD (Pfeil), diese entspricht der Amplifikation von cDNA aus der Rückwärtssubtraktion.

Abschnitt B: Die cDNA-Bande welche bei den beiden unsubtrahierten Proben USL und USD zu sehen ist, fehlt bei der Probe SL (Pfeil), diese entspricht der Amplifikation von cDNA aus der Vorwärtssubtraktion.

Zusammengefasst ergab die Subtraktive Hybridisierung mit anschließender PCR-Amplifikation der gebildeten cDNA-Hybriden die folgenden Resultate:

- 1.) cDNA-Fragmente welche in beiden unsubtrahierten Proben vorkamen wurden bei der PCR-Amplifikation unterdrückt.
- 2.) cDNA-Fragmente welche nur in einer der beiden unsubtrahierten Proben vorkamen wurden durch die PCR mit cDNA aus der entsprechenden Subtraktion (Vorwärts oder Rückwärts) exponentiell amplifiziert.

Mit der Subtraktiven Hybridisierung und der anschließenden PCR-Amplifikation sollten cDNA-Fragmente welche nur in der cDNA-Probe aus der *Geosiphon*-Lichtinkubation vorkamen angereichert werden. Die cDNA-Fragmente welche sowohl in der licht-, als auch in der dunkelinkubierten Probe vorkamen sollten hingegen unterdrückt werden. Mit welcher Effizienz diese Reaktionen erfolgt sind, wurde mit einer weiteren PCR untersucht. Dazu wurden spezifische Primer für ein konstitutiv exprimiertes Gen (Proteingen für eine ribosomale Untereinheit) aus *Geosiphon* verwendet (18M4-UC/18M4-LC, siehe **2.8.24.3** und **2.8.24.4**). Amplifiziert wurde je ein Aliquot von subtrahierter und unsubtrahierter cDNA aus der Vorwärtssubtraktion. Nach verschiedenen Zyklenzahlen wurden Proben entnommen und auf einem Agarosegel analysiert. Wie in Abb. 29 zu erkennen ist, erscheint die Bande des PCR-Produktes bei der Amplifikation der unsubtrahierten cDNA nach 15 PCR-Zyklen, bei der subtrahierten cDNA dagegen erst nach 20 Zyklen.

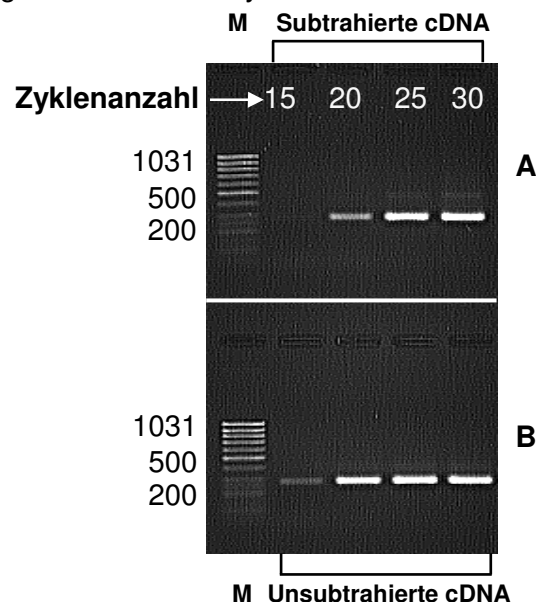


Abb. 29: Agarosegelanalyse der PCR zur Untersuchung zur Effizienz der subtraktiven Hybridisierung. Gezeigt ist das Ergebnis für die Vorwärtssubtraktion, das der Rückwärtssubtraktion war im Wesentlichen identisch (M = Marker, Größe in bp). Die verwendeten Primer waren spezifisch für ein konstitutiv exprimiertes Gen aus *Geosiphon*. Amplifiziert wurde jeweils ein Aliquot der subtrahierten (A) und der unsubtrahierten cDNA (B). Zu erkennen ist, dass bei beiden Ansätzen verschiedene Zyklenzahlen benötigt werden um ein sichtbares Produkt zu erzeugen. Bei der subtrahierten cDNA werden dafür ca. 5 Zyklen mehr als bei der unsubtrahierten cDNA benötigt.

Diese Differenz von 5 Zyklen entspricht einer Reduktion der cDNA-Sequenzen konstitutiv exprimierter Gene in der subtrahierten cDNA-Probe um etwa das 20-fache (Nach Protokoll für das „Clontech PCR-Select cDNA Subtraction Kit“, Protocol # PT 1117-1, Version # PR06687, June 2000). Aus diesem subtrahierten Gemisch verschiedener cDNAs, sollten durch das im Folgenden beschriebene differentielle Screening einzelne cDNA-Sequenzen isoliert werden.

3.1.5 Differentielles Screening klonierter cDNA aus der Vorwärtssubtraktion

In der unter **3.1.4** erhaltenen subtrahierten cDNA sollten cDNA-Fragmente von Genen angereichert sein, welche in *Geosiphon* im Licht stärker als im Dunkeln exprimiert wurden. Durch das differentielle Screening wurde versucht, solche Fragmente zu isolieren. Zunächst wurde das Nested-PCR-Produkt aus der Vorwärtssubtraktion (**SL**, siehe **3.1.4**) kloniert. Anschließend wurden die Plasmidinserts von gewachsenen Klonen mit einer colony-PCR amplifiziert.

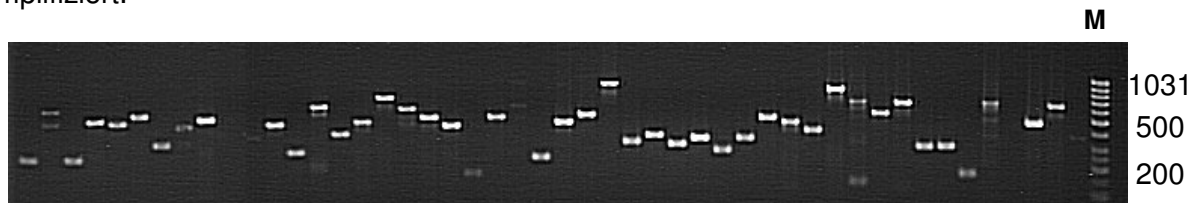


Abb. 30: Agarosegelanalyse einer colony-PCR mit Klonen aus der Klonierung von Nested-PCR amplifizierter cDNA aus der Vorwärtssubtraktion (M = Marker, Größe in bp). Zu erkennen sind die PCR-Produkte von positiven Klonen mit Größen in einem Bereich von 100 bis >1000 bp.

Ein repräsentativer Ausschnitt aus einem Agarosegel von einer solchen colony-PCR ist in Abb. 30 gezeigt. Die Größen der PCR-Produkte lagen in einem Bereich von etwa 100 bis 1000 bp. Für das anschließende Screening wurden 94 der erhaltenen PCR-Produkte denaturiert und auf eine Nylonmembran geblottet. Als Negativkontrolle wurden zwei cDNA-Fragmente menschlichen Ursprungs geblottet. Von einem solchen Blot wurden vier identische Exemplare hergestellt. Je einer der Blots wurde anschließend mit einer der folgenden cDNA-Proben (vgl. **3.1.4**) hybridisiert: **SL** (Nested-PCR Produkt der Vorwärtssubtraktion), **SD** (Nested-PCR Produkt der Rückwärtssubtraktion), **USL** (Nested-PCR Produkt der unsubtrahierten cDNA der Vorwärtssubtraktion) und **USD** (Nested-PCR Produkt von der unsubtrahierten cDNA der Rückwärtssubtraktion). Durch die Hybridisierung mit den vier verschiedenen Proben sollten die cDNA-Fragmente differentiell exprimierter Gene markiert werden. Die Hybridisierung mit der cDNA SL diente hierbei als Positivkontrolle. Die Hybridisierung mit der cDNA USL sollte ein schwächeres Signal als bei SL ergeben. Die Hybridisierungen mit den cDNAs SD und USD sollten keine oder nur sehr schwache Signale zeigen (siehe **2.8.35**). Insgesamt wurden die colony-PCR-Produkte von 282 Klonen mit drei Sätzen von je vier Blots gescreent. Abb. 31 zeigt die erhaltenen Hybridisierungssignale.

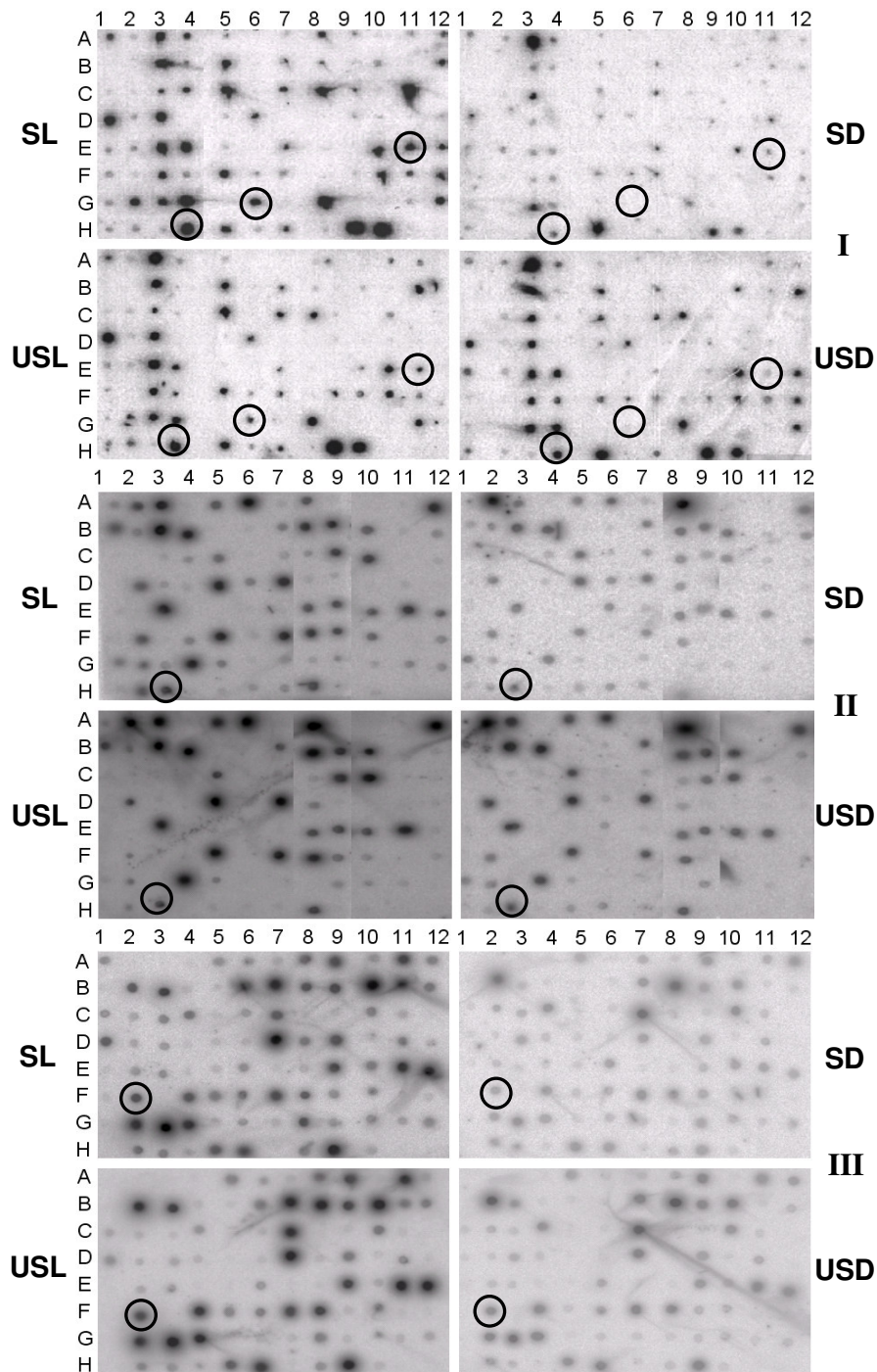


Abb. 31: Hybridisierung klonierter Nested-PCR-Produkte von cDNA aus der Vorwärtssubtraktion (SL). Insgesamt wurden 3 x 94 PCR Produkte geblottet (Sätze I-III). Hybridisiert wurde die cDNA mit radioaktiv markierter cDNA aus der Nested-PCR-Amplifikation folgender Proben: cDNA der Vorwärtssubtraktion (**SL**), cDNA der Rückwärtssubtraktion(**SD**) und der cDNA der beiden unsubtrahierten Kontrollen (**USL** und **USD**). Die Kreise markieren fünf Beispiele von cDNAs deren Gene differentiell exprimiert sein könnten. Auf den Positionen B1 und B2 (Satz I), H11 und H12 (Sätze II und III) wurden die Negativkontrollen geblottet (cDNA menschlichen Ursprungs).

Bei der Auswertung der Blots wurden cDNA Fragmente identifiziert deren entsprechende Gene differentiell exprimiert sein könnten. Die schwachen Hybridisierungssignale der

gewählten cDNA-Fragmente bei den Hybridisierungen mit SD und USL wurden als Hintergrund gewertet. Die Plasmidinserts von insgesamt 43 der entsprechenden Klone wurden sequenziert. Es zeigte sich, dass sich viele der identifizierten Sequenzen nur in der Länge unterschieden, ansonsten aber identisch waren. Insgesamt wurden fünf unterschiedliche Sequenzen identifiziert. Mittels BLASTP und BLASTX wurde untersucht ob diese Sequenzen Ähnlichkeiten zu Genen bzw. den entsprechenden Proteinen in online-Sequenzdatenbanken zeigten, die daraus erstellte Annotation ist in Tabelle 8 gezeigt.

Tabelle 8: Annotation von cDNA-Sequenzen welche aufgrund der Resultate des differentiellen Screenings sequenziert wurden. Insgesamt wurden die Plasmidinserts von 43 Klonen sequenziert. Einige der Sequenzen waren jedoch bis auf ihre unterschiedliche Länge identisch. Annotiert wurde jeweils der längste Vertreter von insgesamt fünf verschiedenen Sequenzen.

cDNA	Länge (bp)	Ähnlichstes Protein	Organismus/ Accession	Identität (AS)	Ähnlichkeit (AS)	Anzahl ähnlicher Sequenzen
hm24-E11	254	ABC transporter WU-BLASTP	<i>Bacillus licheniformis</i> Q65NE3 BACLD	13/32 (40%)	21/32 (65%)	1
hm24-G6	690	ubiquitin- ribosomal protein fusion NCBI- BLASTX	<i>Candida albicans</i> XM_710374.1	56/62 (90%)	59/62 (95%)	5
hm24-H4	466	ABC transporter, binding protein WU-BLASTX	<i>Rhizobium loti</i> Q986P8 RHILO	14/46 (30%)	23/46 (50%)	29
hm26-H3	587	glucose transporter WU-BLASTP	<i>Cryptococcus neoformans</i> Q5KC74	9/15 (60%)	10/15 (66%)	4
hm27-F2	447	SecY- independent transporter protein WU- BLASTX	<i>Thraustochytrium aureum</i> Q9G4C9	24/77 (31%)	37/77 (48%)	4

Bei kurzen Abschnitten in vier der fünf untersuchten *Geosiphon*-cDNA-Sequenzen konnten Ähnlichkeiten zu Aminosäuresequenzen von Transportproteinen oder Proteinkomponenten von Transportsystemen identifiziert werden. Die Sequenz *hm26-H3* zeigte Ähnlichkeiten zu einem Glukosetransporter eines Basidiomyceten. Bei allen Insertsequenzen waren die ähnlichen Abschnitte relativ kurz, die maximale Länge lag bei 62 AS (*hm24-G6*), der kürzeste ähnliche Bereich einer Sequenz war 15 AS lang (*hm26-H3*). Ob die diesen cDNA-Sequenzen entsprechenden Gene im Licht bzw. Dunkeln tatsächlich in unterschiedlicher Stärke exprimiert wurden, wurde durch die im Folgenden beschriebenen Versuche geprüft.

3.1.6 Überprüfung der durch differentielles Screening erhaltenen cDNA-Sequenzen

Durch das differentielle Screening von klonierten cDNA-Sequenzen aus der subtraktiven Hybridisierung wurden fünf verschiedene cDNA-Fragmente isoliert (siehe 3.1.5). Ob die entsprechenden Gene in *Geosiphon* im Licht stärker als im Dunkeln exprimiert werden, sollte durch ein weiteres Experiment überprüft werden. Dazu wurden zunächst aus den verschiedenen Sequenzen spezifische Primerpaare abgeleitet. Anschließend folgte eine polyA-RNA-Isolation aus *Geosiphon*-Blasen welche zuvor verschieden lange im Licht bzw. im Dunkeln inkubiert wurden. Die daraus synthetisierte cDNA wurde als Template für eine semi-quantitative PCR mit den beschriebenen Primern eingesetzt. Es wurde untersucht, ob sich die vermutete unterschiedlich starke Expression in Form unterschiedlicher Bandenstärken auf dem Agarosegel zeigen würde. Eine Kontroll-PCR mit genspezifischen Primern eines konstitutiv exprimierten Gens (Elongationsfaktor *EF-1 α* aus *Geosiphon*) sollte generelle Unterschiede in der Templatekonzentration sichtbar machen. Mit drei der fünf Primerpaare wurde durch die PCR ein Produkt erhalten. Die Agarosegelanalyse der PCR mit den verschiedenen Primern ist in Abb. 32 gezeigt.

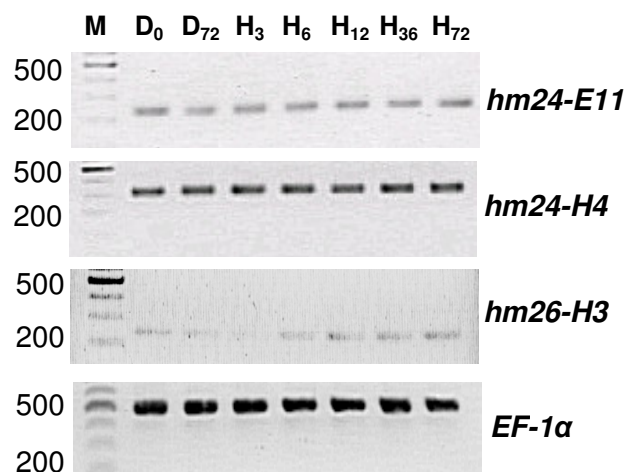


Abb. 32: Agarosegelanalyse der RT-PCR mit genspezifischen Primern für drei durch das differentielle Screening identifizierte cDNA-Sequenzen. Die Kontroll-PCR wurde mit genspezifischen Primern für den konstitutiv exprimierten Elongationsfaktor *EF-1 α* aus *Geosiphon* durchgeführt. (M = Marker, Größe in bp, verwendete Templates: D₀ = cDNA aus *Geosiphon*-Blasen welche unmittelbar vor Beginn der Lichtphase des normalen Tag/Nachtrhythmus entnommen wurden; D₇₂ = cDNA aus Blasen welche 72 h im Dunkeln inkubiert wurden; H₃ = cDNA aus Blasen welche 3 h im Licht inkubiert wurden; H₁₂ = cDNA aus Blasen welche 12 h im Licht inkubiert wurden; H₃₆ = cDNA aus Blasen welche 36 h im Licht inkubiert wurden; H₇₂ = cDNA aus Blasen welche 72 h im Licht inkubiert wurden).

Die PCR-Produkte mit den Primern für *hm24-E11* und *hm24-H4* zeigten keine Unterschiede aus denen auf eine differentielle Expression der untersuchten Gene geschlossen werden konnte. Das PCR-Ergebnis für *hm26-H3* zeigte ein Bandenmuster welches auf eine Regulation hinweisen könnte. Eine weitere PCR, mit einem anderen Primerpaar für diese

Sequenz (27-F5U/27-F5L), zeigte jedoch ein Bandenmuster mit einheitlichen Stärken. Anhand der Kontroll-PCR kann man erkennen, dass die Templatekonzentrationen in den Ansätzen einheitlich war.

Die Versuche mit subtraktiver Hybridisierung und differentiellem Screening führten somit nicht zur Isolation der cDNA eines differentiell im Licht bzw. im Dunkeln regulierten, symbiosespezifischen Genes aus *Geosiphon*. Dieser methodische Weg wurde daher zurückgestellt. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde dieses Ziel durch Aufbau einer cDNA-Bank und anschließender funktioneller Hefekomplementation erreicht.

3.2. Aufbau einer Hefeexpressions-cDNA-Bank von *Geosiphon pyriformis* und funktionelle Komplementation der Hefemutante EBY VW4000

Durch funktionelle Komplementation der Hefemutante EBY VW4000 sollte die cDNA eines Zuckertransporters aus *Geosiphon* isoliert werden. Als Basis der im Folgenden beschriebenen Experimente wurde aus *Geosiphon* zunächst eine gerichtet klonierte und nach Größe fraktionierte cDNA-Bank aufgebaut. Dazu wurde der Hefe-Expressionsvektor pDR196SFI verwendet. Der anschließend mit Plasmiden aus dieser Bank transfizierte Hefestamm EBY VW4000 ist aufgrund mehrerer Mutationen nicht in der Lage Hexosen aufzunehmen. Eine erfolgreiche Transfektion der Hefe mit der cDNA eines Zuckertransporters aus *Geosiphon* sollte es ihr ermöglichen Hexosen wieder aufnehmen zu können. Nach der Transfektion wurde die Hefe auf einem geeigneten Selektivmedium nach positiven Klonen gescreent.

3.2.1 Aufbau der Hefeexpressions-cDNA-Bank von *Geosiphon pyriformis*

Zum Aufbau einer Hefeexpressions-cDNA-Bank wurde zunächst cDNA aus der polyA-RNA von 650 *Geosiphon*-Blasen synthetisiert. Dazu wurde das „Creator SMART-cDNA Library Construction Kit“ verwendet. Dieses Kit ist eine Variante des zur cDNA-Synthese für die subtraktive Hybridisierung unter 3.1.2 verwendeten „SMART-Systems“. Der wesentliche Unterschied besteht darin, dass die mit diesem Kit hergestellte cDNA, über assymetrische Schnittstellen für das Restriktionsenzym *Sfi* I, gerichtet in einen entsprechenden Vektor ligiert werden kann. Die in Abb. 33 gezeigte Agarosegelanalyse der synthetisierten cDNA ergab einen „Schmier“ mit einem Größenbereich von etwa 500 bis 8000 bp.

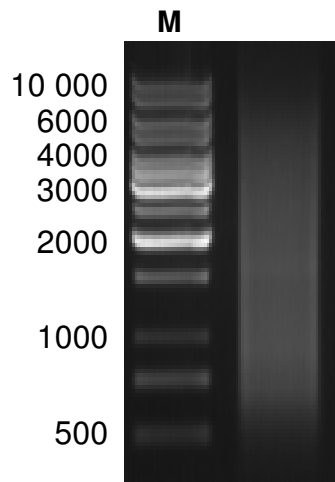


Abb. 33: Agarosegelanalyse von cDNA welche mit dem „Creator SMART-cDNA Library Construction Kit“ synthetisiert wurde (M = Marker, Größe in bp). Zu erkennen ist, dass der Größenbereich des „cDNA-Schmiers“ etwa von 500 bis 8000 bp reicht.

Um aus der cDNA kürzere Sequenzen zu entfernen, wurden zwei Agarosegelextraktionen durchgeführt. Dabei wurde jeweils die gesamte cDNA mit einer Länge über 1000 bp aus dem Gel ausgeschnitten, zur Kontrolle wurde eine Agarosegelanalyse durchgeführt.

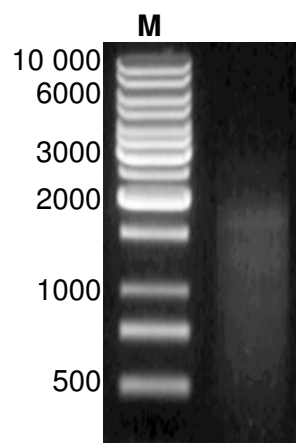


Abb. 34: Agarosegelanalyse von SMART-cDNA nach Fraktionierung der Größe durch zweifache Agarosegelextraktion (M = Marker, Größe in bp). Erkennbar ist, dass sich der Größenbereich im Vergleich mit der cDNA vor der Fraktionierung nur gering verändert hat (vgl. Abb. 33).

Wie sich anhand des Agarosegels auf Abb. 34 erkennen lässt, wurde die Größenverteilung der cDNA durch die Fraktionierung jedoch nur gering verändert. Anschließend wurden die cDNA und der Hefeexpressionsvektor pDR196SFI mit *Sfi* I geschnitten und miteinander ligiert. Der Vektor pDR196SFI stellt einen, durch Einfügen der Schnittstellen *Sfi* IA und *Sfi* IB für das Restriktionsenzym *Sfi* I in die MCS, modifizierten Vektor pDR196 dar. Das Ergebnis der Ligation wurde auf einem Agarosegel überprüft (Abb. 35).

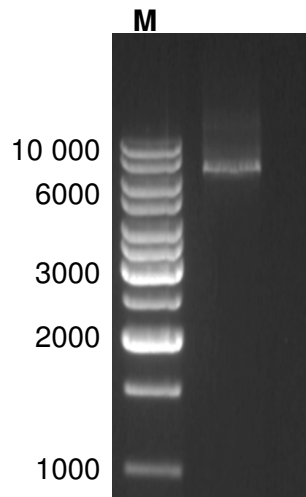


Abb. 35: Agarosegelanalyse der Ligation von nach Größe fraktionierter *Geosiphon*-cDNA mit dem Vektor pDR196SFI. (M = Marker, Größe in bp). Zu erkennen ist das Ligationsprodukt als „Schmier“ oberhalb etwa 7000 bp. Nicht mehr erkennbar ist der lineare Vektor (ca. 6400 bp) sowie die cDNA (ca. 500-6000 bp).

Auf dem Agarosegel in Abb. 35 erkennt man das Ligationsprodukt als Schmier oberhalb einer Größe von etwa 7 kb, nicht mehr zu erkennen ist der lineare Vektor (ca. 6400 bp) sowie die cDNA (etwa 500 bis 6000 bp). Dies zeigt, dass der größte Teil der zur Ligation eingesetzten cDNA mit dem Vektor ligiert wurde. Mit dem Ligationsprodukt wurden ultrakompetente *E. coli* (XL 10 Gold, Stratagene) transfiziert. Anhand der Anzahl der nach der Transfektion gewachsenen Klone wurde eine Transfektionseffizienz von $4,2 \times 10^5$ Kolonien/ μg DNA berechnet. Insgesamt wurden $5,72 \times 10^5$ Klone erhalten. Zwei repräsentative Ausschnitte aus Agarplatten mit Klonen aus dieser Transfektion sind in Abb. 36 gezeigt.

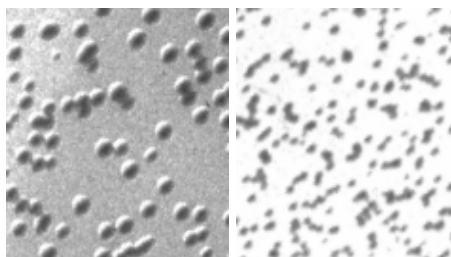


Abb. 36: Repräsentative Ausschnitte von jeweils 1 cm^2 aus Agarplatten mit Klonen aus der *E. coli*-Transfektion mit nach Größe fraktionierter *Geosiphon*-cDNA. Diese war vor der Transfektion in den Vektor pDR196SFI ligiert worden. Die Gesamtzahl der gewachsenen Klone wurde durch Bildung des Mittelwertes aus den Werten von der Auszählung verschieden dicht bewachsener Felder ermittelt.

Um die Qualität der so erhaltenen cDNA-Bank zu prüfen wurden mit einer colony-PCR die Plasmidinserts von 20 zufällig ausgewählten Klonen aus der Transfektion amplifiziert.

Anschließend wurde eine Agarosegelanalyse durchgeführt, das Ergebnis ist in Abb. 37 gezeigt.

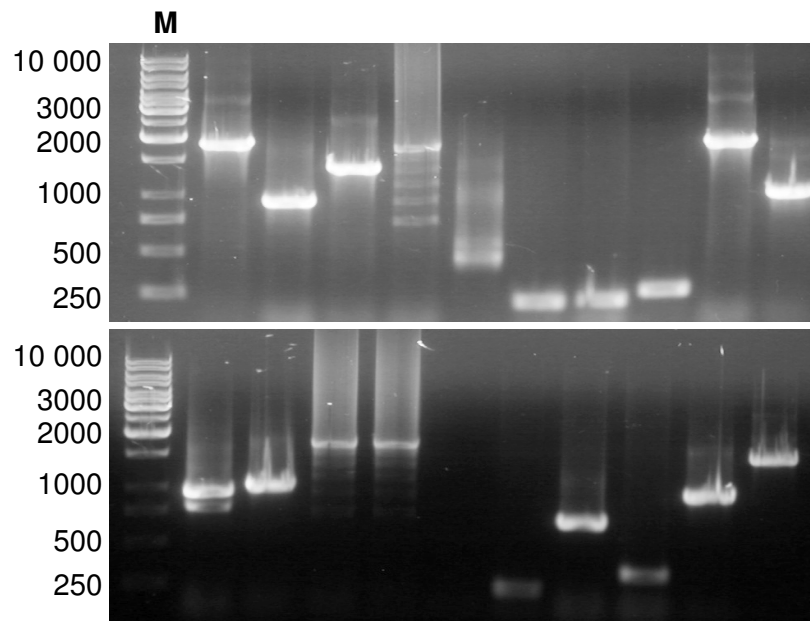


Abb. 37: Agarosegelanalyse der colony-PCR mit 20 zufällig gewählten Klonen aus der cDNA-Bank (M = Marker, Größe in bp). Die Klone waren mit in den Vektor pDR196SFI ligierter, nach Größe fraktionierter *Geosiphon*-cDNA transfiziert worden. Anhand dieses Resultates wurde die durchschnittliche Insertgröße der in der Bank enthaltenen Plasmide mit ca. 1100 bp ermittelt. Wie sich erkennen lässt, konnte bei 19 der 20 analysierten Plasmide ein PCR-Produkt amplifiziert werden. Aus diesem Wert ergab sich, dass etwa 95 % der in der Bank enthaltenen Klone rekombinant sind.

Die Agarosegelanalyse ergab, dass durch die colony-PCR bei 19 der 20 analysierten Plasmide ein cDNA-Insert mit einer durchschnittlichen Größe von 1100 bp amplifiziert wurde. Aus der Anzahl der erhaltenen PCR-Produkte ergab sich, dass etwa 95 % der in der cDNA-Bank enthaltenen Klone rekombinant sind. Diese so genannte „Primärbank“ wurde anschließend abgeerntet und als Dauerkultur gelagert. Für die anschließende Plasmidpräparation wurde eine „Sekundärbank“ angelegt. Dazu wurden zunächst verschiedene Verdünnungsstufen eines Aliquots der Primärbank ausplattiert. Ziel dieser Plattierung war es, herauszufinden welche Verdünnung gewählt werden sollte, wenn ein möglichst dichter Bewuchs der Agarplatten ohne „Rasenbildung“ erreicht werden sollte. Das Ergebnis der Titerbestimmung ist in Abb. 38 gezeigt.

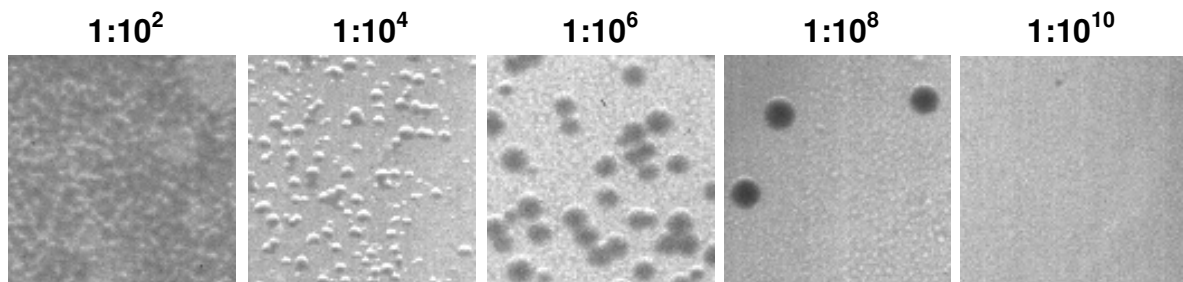


Abb. 38: Titerbestimmung der cDNA-Primärbank. Abgebildet sind je 1 cm² große Ausschnitte aus den Agarplatten der verschiedenen ausplattierten Verdünnungen. Über den einzelnen Ausschnitten angegeben, der entsprechende Verdünnungsschritt des Primärbankaliquots.

Für die Plasmidpräparation wurden ca. 10⁵ Klone benötigt. Diese wurden, unter Berücksichtigung der Titerbestimmung, durch die Plattierung eines 1:10³ verdünnten Aliquots der Primärbank erhalten. Mit Aliquots der durch diese Plasmidpräparation erhaltenen Plasmidbank wurde in den nächsten Schritten die Hefetransfektion durchgeführt.

3.2.2 Funktionelle Komplementation der Hefemutante EBY VW4000

Die Hefemutante EBY VW4000 ist aufgrund mehrerer Mutationen in den Genen für Zuckertransportproteine nicht in der Lage Hexosen aufzunehmen. Auf einem Selektivmedium mit einer bestimmten Glukosekonzentration (siehe 3.2.2.1) als einziger Kohlenstoffquelle ist diese Mutante daher nicht lebensfähig. Der Hefestamm wurde zunächst mit den Plasmiden aus der *Geosiphon*-cDNA-Bank transfiziert. Auf einem entsprechenden Selektivmedium wurde nach Klonen gescreent, welche durch die cDNA-Transfektion die Fähigkeit zur Glukoseaufnahme wiedererlangt hatten.

3.2.2.1 Bestimmung einer zur Selektion geeigneten Glukosekonzentration

Zu Beginn der Arbeit mit EBY VW4000 war nicht bekannt, welche Glukosekonzentration für das beim späteren Screening nach positiven Klonen benötigte Selektivmedium verwendet werden musste. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass bei hoher Konzentration auch nicht komplementierte Mutanten Glukose aufnehmen. Dies hätte zu einer erheblichen Anzahl falschpositiver Klone geführt. Eine zu geringe Konzentration hingegen hätte auch das Wachstum positiver Klone verhindert. Daher wurden EBY VW4000 und der entsprechende Wildtyp EBY CT parallel auf Agarplatten mit jeweils verschiedene Glukosekonzentrationen plattiert. Das Ergebnis dieses Wachstumstests ist in Abb. 39 gezeigt.

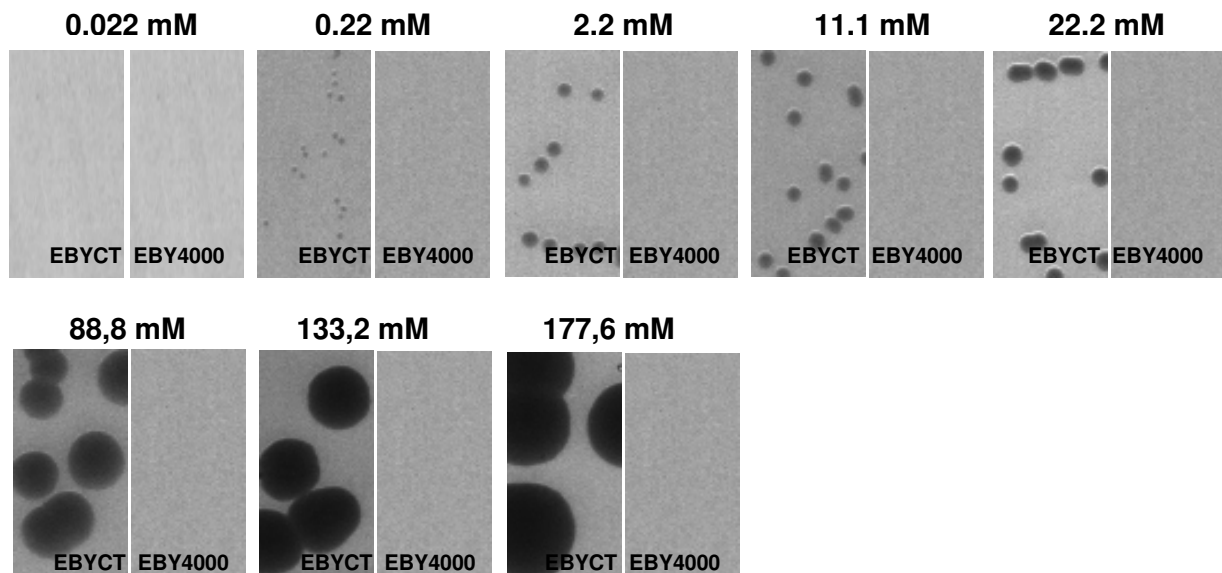


Abb. 39: Bestimmung einer zur Selektion positiver Transformanten von EBY VW4000 geeigneten Glukosekonzentration. Die Hefestämme EBY VW4000 und EBY CT (Wildtyp) wurden parallel auf Agarmedien mit verschiedenen Glukosekonzentrationen plattiert. Die Dokumentation erfolgte nach fünf Tagen Inkubation bei 29° C. Pro Konzentration sind je zwei repräsentative Ausschnitte der Agarplatten von je $\frac{1}{2}$ cm² abgebildet. Wie sich erkennen lässt, konnte der Wildtyp bereits ab 0,22 mM wachsen, dagegen bildete die Defektmutante EBY VW4000 selbst auf hohen Glukosekonzentrationen keine Kolonien.

Es zeigte sich, dass die Mutante auf keiner der angebotenen Glukosekonzentrationen wachsen konnte. Selbst bei der sehr hohen Konzentration von 177,6 mM waren nach der Inkubationszeit von fünf Tagen keine Kolonien zu erkennen. Der Wildtyp bildete jedoch bereits ab 0,22 mM kleine Kolonien. Anhand dieses Ergebnisses wurde für das Selektivmedium eine Glukosekonzentration von 22 mM gewählt. Bei dieser Konzentration ist Hefe in der Lage relativ gut zu wachsen. Der Hefestamm EBY VW4000 wird durch seine Mutationen nicht in der Fähigkeit zur Aufnahme von Disacchariden beeinträchtigt. Daher wurden EBY VW4000 und EBY CT parallel auf Agarmedien mit verschiedenen Maltosekonzentrationen plattiert um die Vitalität der Zellen zu prüfen. Bei diesem Wachstumstest wurde ein gleichmäßiges Koloniewachstum beider Hefestämme erwartet; das Ergebnis ist in Abb. 40 gezeigt.

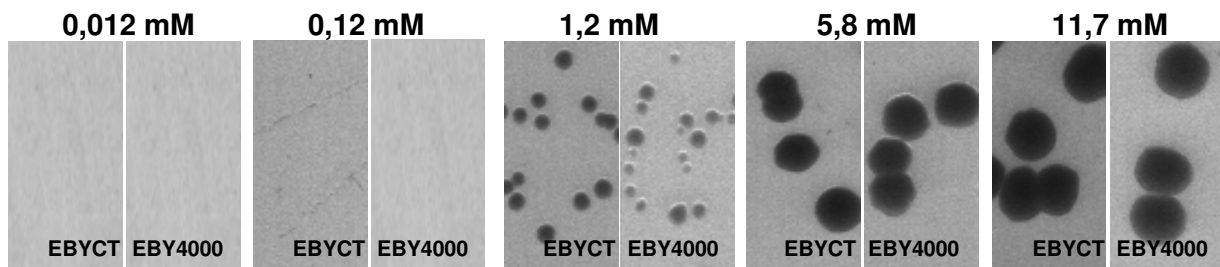


Abb. 40: Parallelplattierung von EBY CT und EBY VW4000 (EBY4000) auf Agarmedien mit verschiedenen Konzentrationen des Disaccharids Maltose. Die Dokumentation erfolgte nach fünf Tagen Inkubation bei 29° C. Pro Konzentration sind je zwei repräsentative Ausschnitte der Agarplatten von je $\frac{1}{2} \text{ cm}^2$ abgebildet. Wie zu erkennen ist, wachsen beide Hefestämme ab einer Konzentration von 0,12 mM Maltose und bilden etwa gleich große Kolonien.

Bei diesem als Positivkontrolle durchgeführten Wachstumstest konnte nach fünf Tagen ein gleichmäßiges Wachstum von EBY VW4000 und EBY CT ab einer Maltosekonzentration von 0,12 mM beobachtet werden.

3.2.2.2 Transfektion von EBY VW4000 mit Plasmiden aus der *Geosiphon*-cDNA-Bank

Die Hefemutante EBY VW4000 wurde mit den aus der *Geosiphon*-cDNA-Bank isolierten Plasmiden transfiziert (siehe 3.2.2.1). Als Negativkontrolle wurde eine Transfektion mit pDR196SFI-K (pDR196SFI mit Kontrollinsert, siehe 2.11.19.5) durchgeführt. Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Mutationen trägt EBY VW4000 noch eine weitere Mutation im Gen *URA3*. Dadurch ist dieser Hefestamm nicht in der Lage den RNA-Baustein Uracil zu synthetisieren und kann somit auf Medium ohne Uracil nicht wachsen. Der zum Aufbau der *Geosiphon*-cDNA-Bank verwendete Hefeexpressionsvektor pDR196SFI trägt das intakte Gen *URA3*. Auf einem ersten Selektionsmedium ohne Uracil, aber mit 2 % Maltose als Kohlenstoffquelle wurde in beiden Transfektions-Ansätzen nach erfolgreich mit Plasmiden transformierten EBY VW4000-Klonen gescreent (Abb. 41).

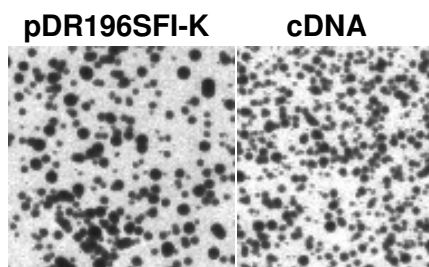


Abb. 41: Ergebnis der ersten Selektion nach der Transfektion von EBY VW4000 mit Plasmiden aus der *Geosiphon*-cDNA-Bank (**cDNA**) und mit dem Kontrollvektor (**pDR196SFI-K**). Für diese Selektion wurde ein Agarmedium ohne Uracil und mit 2 % Maltose verwendet. Abgebildet ist je ein repräsentativer Ausschnitt mit einer Größe von 1 cm^2 . Die auf dem gewählten Selektionsmedium gewachsenen Klone beider Ansätze hatten durch die Transfektion ein Plasmid aufgenommen. Die Dokumentation der Platten erfolgte nach fünf Tagen Inkubation bei 29° C.

Die nach der Plattierung gewachsenen Klone wurden in Feldern von 1 cm² Fläche ausgezählt, aus dem arithmetischen Mittel der Kolonieanzahl dreier Felder wurde die Effizienz der Transfektionen berechnet. Für die Transfektion mit Plasmiden der cDNA-Bank ergab sich eine Effizienz von $2,1 \cdot 10^4$ Kolonien/ μ g Plasmid-DNA. Für die Kontrolltransfektion mit pDR196SFI-K wurde eine Effizienz von $1 \cdot 10^4$ / μ g Plasmid-DNA ermittelt. Alle nach der ersten Selektion gewachsenen Klone der cDNA-Transfektion wurden von den Platten abgeerntet und miteinander vermischt, mit den Klonen der Negativkontrolle wurde gleich verfahren. Anschließend wurden Aliquots der beiden Klöngemische zur zweiten Selektion ausplattiert. Diese erfolgte auf Agarmedium ohne Uracil und mit 22 mM Glukose als einziger Kohlenstoffquelle. Bei dieser zweiten Selektion wurde unter den Transformanten nach Klonen mit wiederhergestellter Fähigkeit zur Glukoseaufnahme gescreent. Als Positivkontrolle zur Überprüfung der Vitalität der Hefezellen wurden Aliquots der beiden Ansätze auf Agarmedium mit 2 % Maltose als Kohlenstoffquelle plattiert. Das Ergebnis der verschiedenen Plattierungen zur zweiten Selektion ist in Abb. 42 dargestellt.

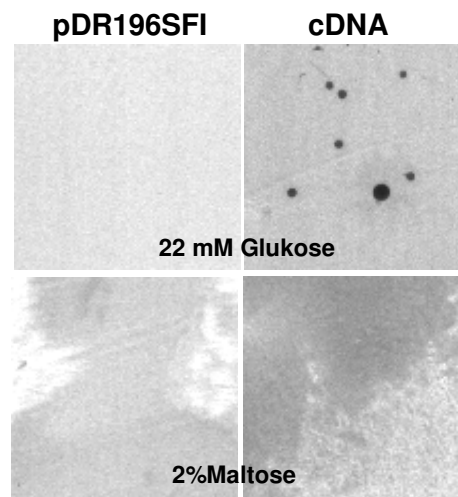


Abb. 42: Ergebnis der zweiten Selektion nach der Transfektion von EBY VW4000 mit *Geosiphon*-cDNA (**cDNA**) und mit dem Kontrollvektor (**pDR196SFI-K**). Beide Ansätze wurden zunächst auf Agarmedium ohne Uracil und mit 22 mM Glukose plattiert. Die auf diesen Platten gewachsenen Klone hatten die Fähigkeit zur Glukoseaufnahme durch die Transfektion wiedererlangt. Bei der Plattierung, der mit *Geosiphon*-cDNA transformierten Hefe, waren Einzelkolonien zu sehen, bei der Negativkontrolle mit pDR196SFI-K waren keine Kolonien gewachsen. Als Positivkontrolle wurden die beiden Ansätze auf Agarmedium ohne Uracil und mit 2 % Maltose plattiert. Auf diesen sollten, wie bei der ersten Selektion, alle Klone wachsen welche durch Transfektion ein Plasmid aufgenommen hatten. Wie sich erkennen lässt, hatte sich bei beiden Ansätzen ein gleichmäßiger Zellrasen gebildet. Pro Ansatz ist je ein repräsentativer Ausschnitt aus einer Agarplatte mit einer Größe von 2x2cm abgebildet. Die Dokumentation der Platten erfolgte nach fünf Tagen Inkubation bei 29 °C.

Auf den Glukoseplatten der zweiten Selektion waren nur Hefe-Klone aus dem mit cDNA transformierten Ansatz gewachsen. Pro Platte (Ø 14 cm) waren dies ca. 100-200 Kolonien

unterschiedlicher Größe (\varnothing 0,1-1mm). Im Vergleich dazu waren auf den Platten der ersten Selektion (\varnothing 14 cm) etwa $4 \cdot 10^4$ Kolonien gewachsen. Somit wurde die Anzahl der Kolonien durch die zweite Selektion deutlich reduziert. Auf der Platte der mit pDR196SFI-K transformierten Hefe waren keine Kolonien zu erkennen.

Die Maltoseplatten der Positivkontrolle zur zweiten Selektion waren mit einem gleichmäßigen Heferasen bewachsen. Dies zeigte, dass die geringere Koloniezahl durch die Selektionsbedingungen und nicht durch reduzierte Vitalität der Hefezellen verursacht wurde. Nach dieser zweiten Selektion wurden 32 Klone zufällig ausgewählt und auf Platten mit frischem Selektivmedium replattiert. Dadurch wurde überprüft, ob das Wachstum der Klone unter Selektivbedingungen reproduzierbar war. Ein Ausschnitt aus der Replattierung eines dieser Klone (HMY13-S12) ist in Abb. 43 gezeigt.

HMY13-S12

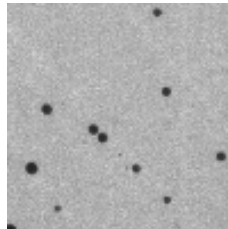


Abb. 43: Replattierung eines mit *Geosiphon*-cDNA transformierten EBY VW4000-Klons (HMY13-S12) auf Selektivmedium (ohne Uracil, mit 22 mM Glukose). Der Klon wurde von einer Platte der zweiten Selektion auf frisches Agarmedium replattiert. Abgebildet ist ein 1 cm^2 großer, repräsentativer Ausschnitt aus der mit Einzelkolonien bewachsenen Agarplatte. Die Dokumentation der Platte erfolgte nach fünf Tagen Inkubation bei 29°C .

3.2.2.3 PCR-Analyse positiver Klone aus der EBY VW4000-Transfektion

Die Transfektion der Hefemutante EBY VW4000 mit Plasmiden der *Geosiphon*-cDNA-Bank ergab nach Inkubation der transformierten Hefe auf Selektivmedium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle positive Klone. Die Plasmide 30 zufällig ausgewählter Klone wurden mit einer colony-PCR analysiert. Als Primer wurden die für den Vektor pDR196SFI spezifischen Primer ADHclose und PMA5 verwendet. Die Agarosegelanalyse der colony-PCR ist in Abb. 44 gezeigt.

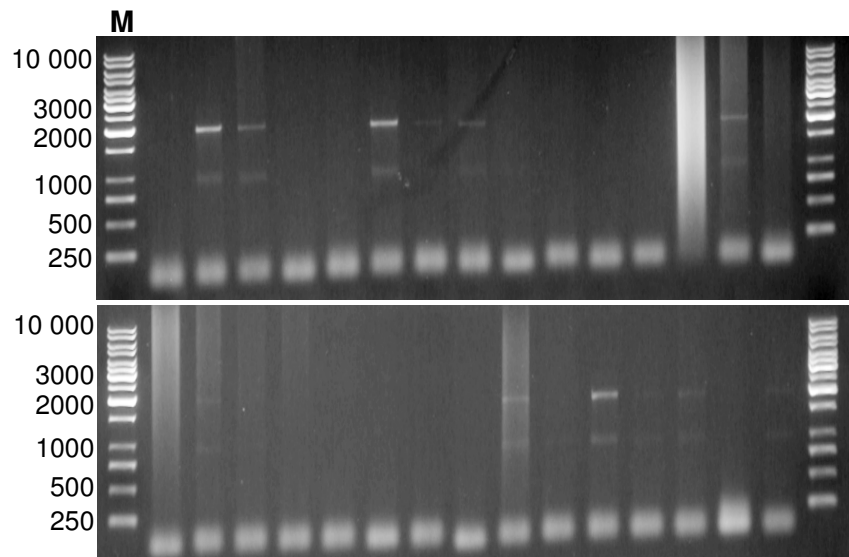


Abb. 44: Agarosegelanalyse der colony-PCR mit 30 positiven Klonen aus der Transfektion von EBY VW4000 mit *Geosiphon*-cDNA (M = Marker, Größe in bp). Wie sich erkennen lässt, konnte bei etwa 10-15 der 30 Klone ein PCR-Produkt mit einer Größe von etwa 2000 bp amplifiziert werden. Weiter lässt sich jeweils ein kleineres, unspezifisches PCR-Produkt bei etwa 1000 bp erkennen.

Auf der Abbildung des Agarosegels kann man erkennen, dass bei etwa 10 der 30 untersuchten Klone ein PCR-Produkt von ca. 2000 bp und ein weiteres, unspezifisches Produkt von ca. 1000 bp gebildet wurde.

3.2.2.4 Sequenzanalyse der colony-PCR-Produkte

Die Plasmidinserts von positiven Klonen aus der EBY VW4000-Transfektion mit *Geosiphon*-cDNA wurden mit einer colony-PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte der Klone HMY13-S12, HMY13-S26 und HMY13-S617 mit einer Länge von ca. 2000 bp wurden sequenziert. Die Analyse der Sequenzen zeigte, dass sie identisch und 1845 bp lang waren. Die folgenden Untersuchungen wurden mit der in Abb. 45 gezeigten cDNA-Sequenz des Klones HMY13-S12 durchgeführt. Aus dieser cDNA-Sequenz konnten die Aminosäuresequenzen von drei überlappenden, putativen ORFs mit einer Länge von 432 AS (ORF 1), 480 AS (ORF 2) und 496 AS (ORF 3) abgeleitet werden. Die cDNA-Sequenz von ORF 1 beginnt mit dem regulären Startcodon ATG, die von ORF 2 mit dem alternativen Startcodon TTG. Der Leserahmen von ORF 3 beginnt ohne Startcodon direkt mit dem 5'-Ende der cDNA. Alle drei ORFs enden an der gleichen Position mit dem Stopcodon TGA. Die cDNA-Sequenz von HMY13-S12 und die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen der drei ORFs sind in Abb. 45 dargestellt.

cDNA-Sequenz (1845 bp)

GTCGGTAAAAATCCAGATTCAAAAAACGCCGCTTTACCCACTTTTTGCT**TTG**TTTGTAGCATTAGTTAGTGTAAATAGGTGCTTT
 TGAGAATGGGTGGAATACTAGTGTCTCAAATGTACCAGAAAAAATTATTCGTGATTGTAAAAATGGTCAAAAAATGTCAATA
 TCGGTGTTTTTACCAGATTGTTTT**ACCAATG**GAAAAATTTACTCTGGGGATTGCGGTGGGAAGTTACGCAATTGGTGGCCTAATT
 GGTGGTATCTCTGCTGGTTATTTACAAACTCGCTTTTGCCGAATTTCGAACACTTGTGGGAATAATTTTAGCTTTATCTTGGG
 TGCACTAATACTGGGATCTGCCGTTAATCCTGGTATGTTTATCATTGGACGCATCTTGACTGGAGTTGGGAGTGGTATTTCAA
 CTGTGACAGTTCCGACATACTTGGGTGAAATCGCTACGGTGAAGGCGCAGGAGCACTTGGGACCATTATCAATTATTTCTT
 GTAATCGGTATCTTGTCTACTCAAATTATCGGGCTTCTATTATCATCTGTACCTGGATGGAGAATTCTATTAGCCCTGACGGC
 AATTCAGCCTTGATTCAATTAATATTATTACGTTTTTGTGTTGAAACACCACGTTACCTCATTTTACAGAATAAATTGGATG
 AAGCGCAACAGTCGTTACAACCTTTACGACCCGGATTGATGTTACGAATGAATATAAAGAAATTTATGATGGGCAACAAGAA
 GCTGAAACTGTGCAATCAGGAGATCCTGAAAAAATCCAAAAACAAAGGACCCTAAATCTATTTCTCCGGTGAAGAAAAATC
 TGTATCGTTTCTCAACTTTTTTAGAGATCCAATGTGTGAGAAAGATGACTATCATTGTGTACTCTATCAGCTATACAACAAC
 TTTCCGGCATCAATGGTGTAAATCTTTTATAGTACTTCAATATTTTCAAGATATTCGCGGATAATGCAAAGTATGCGACTGTA
 GGTGTCGGTGTAAATAAATTTAATTTTTACCATGGTCTCCGTGATACTCATTGATCGGCAAGGCAGGAAACGATTATTGTTGGC
 TTCGAAATCGGAATTGTAGTCACTTCAATTCTAGTTGTGCTTGGGTCGATATATTCTATAAATCTTCTGTGGTTGTTGCGAG
 TACTATTATTTGTGTCATCATTGCTATTGGTCTAGGGCCAATCCATTCTAATCATTCCGGAAGTGTGCTACATATGGA
 GTAAGCGCAGCAGCTTCGCTGGCAATGGGTCTTAATGGCTCAGTAATTTTTTAGTAGGTCTAATATCCCAGTTCTTAAAGA
 TGCACCTCAAGAATTATACATTTTTGGTATTTGCTATAATTACATCGTTTGGTGCCATTTTACGCTGCTTTTGTCCCGGAGA
 CCAAAGGACGAACCTTGAGGAAATACATAACGAAAATTTCTAAAGATACAAAGAATTTAGATTCTCAAATGAAATCA**TGATTT**
 CAAAGTTTTCCAATCTAATTATAATTTCTTTGTTAAAAAATGAAATCTTTGATATTCAAGATGTTTATGATCAAATACGATCA
 ATTTTTAGGGATGTTCAATTTAATAATTTAACTTAAAGATTTATTCTACTCAAATGAAATGATTTTCTAATAATATTG
 GGAATCAAAAATGTTTGAATCGGTACTCTTTTAAATTTTCACTTTGAAACAAAAATCTAAAAATAGCATTCTTTTTATATT
 AATGACGAGTCAAGAAGTCAAAATCTTTTCATCGATTCAAGCAATCA**ATTAAA**TTTGATTTTCGTAAATAATGAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAA

ORF1 (432 AS)

MENLLWGFVAVGSYAIGGLIGGISAGYLQTRFGRIRTLVGNNFSFILGALILGSVNP**M**FIIGRILTVGSGISTVTVP**T**YL
 EIATVKARGALGTIYQLFLVIGILFTQIIGLLSSV**P**WRILLALTAIPALIQILLLR**F**CVETPRYLISQNKLD**E**AQ**Q**SLQ**L**
 R**P**GFVDVTNEYKEIYDGQ**Q**EAETVESRDPEKNPKTKDPKSISSGARKSL**S**FAQLFRDPMCRKMTIICVTL**S**AIQ**Q**LSG**I**NGV**I**
 Y**S**TSIFSEVFADNAKYATVG**V**GVINLIFTMVSVILID**RQGRK**RLL**L**ASEIGIVVTSILVVLG**S**IYSINLLVVAVLLFVSS**F**A
 IGLGPI**P**FLI**I**PELLPTYGV**S**AAASLAMGLN**W**LSN**F**LVGLIFPVLKDALKNYTFLVFAIITSF**G**AIFTL**L**FP**P**ET**K**GR**T**LEE**I**
 HNENSKDTKNLDSQ**M**KS

ORF2 (480 AS)

MFVALVSVIGAFENGWNTSVSNVPEKIIIRDCKNGQKHVNIGVLPDCL**P****M**ENLLWGFVAVGSYAIGGLIGGISAGYLQTRFGRIR
 TLVGNNFSFILGALILGSVNP**M**FIIGRILTVGSGISTVTVP**T**YLGEIATVKARGALGTIYQLFLVIGILFTQIIGLLSS
 V**P**WRILLALTAIPALIQILLLR**F**CVETPRYLISQNKLD**E**AQ**Q**SLQ**L**LR**P**GFVDVTNEYKEIYDGQ**Q**EAETVESRDPEKNPKTK
 DPKSISSGARKSL**S**FAQLFRDPMCRKMTIICVTL**S**AIQ**Q**LSG**I**NGV**I**FY**S**TSIFSEVFADNAKYATVG**V**GVINLIFTMVSVIL
 ID**RQGRK**RLL**L**ASEIGIVVTSILVVLG**S**IYSINLLVVAVLLFVSS**F**AIGLGP**I**FLI**I**PELLPTYGV**S**AAASLAMGLN**W**LSN
 FLVGLIFPVLKDALKNYTFLVFAIITSF**G**AIFTL**L**FP**P**ET**K**GR**T**LEE**I**HNENSKDTKNLDSQ**M**KS

ORF3 (496 AS)

VGKNPDSKTAALPT**F**CLFVALVSVIGAFENGWNTSVSNVPEKIIIRDCKNGQKHVNIGVLPDCL**P****M**ENLLWGFVAVGSYAIGGLI
 GGISAGYLQTRFGRIRTLVGNNFSFILGALILGSVNP**M**FIIGRILTVGSGISTVTVP**T**YLGEIATVKARGALGTIYQLFL
 VIGILFTQIIGLLSSV**P**WRILLALTAIPALIQILLLR**F**CVETPRYLISQNKLD**E**AQ**Q**SLQ**L**LR**P**GFVDVTNEYKEIYDGQ**Q**
 AETVESRDPEKNPKTKDPKSISSGARKSL**S**FAQLFRDPMCRKMTIICVTL**S**AIQ**Q**LSG**I**NGV**I**FY**S**TSIFSEVFADNAKYATV
 GVG**V**INLIFTMVSVILID**RQGRK**RLL**L**ASEIGIVVTSILVVLG**S**IYSINLLVVAVLLFVSS**F**AIGLGP**I**FLI**I**PELLPTYG
 V**S**AAASLAMGLN**W**LSN**F**LVGLIFPVLKDALKNYTFLVFAIITSF**G**AIFTL**L**FP**P**ET**K**GR**T**LEE**I**HNENSKDTKNLDSQ**M**KS

Abb. 45: cDNA-Sequenz des Plasmidinserts von HMY13-S12 und die daraus abgeleiteten, putativen Aminosäuresequenzen dreier ORFs von unterschiedlicher Länge. In der cDNA-Sequenz sind das reguläre Startcodon ATG (ORF 1), das alternative Startcodon TTG (ORF 2) das Stopcodon TGA an welchem alle drei ORF enden und das poly-Adenylierungssignal (ATTAAA) fett markiert. Unterstrichen dargestellt die das Startcodon ATG flankierende, so genannte „Kozak-Sequenz“. In der Aminosäuresequenz ist die allen Startcodons entsprechende Aminosäure Methionin (M) rot markiert. Das für Leucin (L) stehende Triplett TTG wird allerdings nur als Startcodon mit Methionin übersetzt. Unterstrichen dargestellte Sequenzabschnitte entsprechen hydrophoben Transmembran-Bereichen. Fett dargestellt sind Sequenzabschnitte welche bei Zuckertransportern konserviert sind.

Die Proteinsequenz des 480 AS langen ORF wurde mit BLASTP auf Ähnlichkeiten zu Proteinsequenzen bekannter Gene in online-Datenbanken untersucht. Es zeigten sich Übereinstimmungen mit Sequenzen von Zuckertransportern. Die beste Homologie mit 58 % Ähnlichkeit und 40 % Identität auf einer Länge von 474 AS bestand zu der Aminosäuresequenz eines Glukose-Transportproteins von *Gadus morhua* (Kabeljau) mit einer Länge von 519 AS. Die 10 besten Treffer der BLASTP-Analyse sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: BLASTP-Analyse der 480 AS langen Sequenz von ORF 2, diese wurde aus dem Ergebnis der Plasmidinsert-Sequenzierung von HMY13-S12 abgeleitet und zeigte Übereinstimmungen mit Sequenzen von Zuckertransportern. Die Tabelle enthält die 10 besten Resultate aus dem BLASTP-Suchergebnis.

Accession (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)	Homologie	Identität	Ähnlichkeit
AAT67456	glucose transporter 3 [<i>Gadus morhua</i>]	190/474 (40%)	278/474 (58%)
NP_036883	solute carrier family 2 [<i>Rattus norvegicus</i>]	184/487 (37%)	274/487 (56%)
AAH49174	MGC53301 protein [<i>Xenopus laevis</i>]	176/492 (35%)	259/492 (52%)
AAL27090	glucose transporter [<i>Eptatretus stoutii</i>]	172/476 (36%)	252/476 (52%)
CAJ18562	Slc2a3 protein [<i>Mus musculus</i>]	174/477 (36%)	248/477 (51%)
AAH58811	Slc2a3 protein [<i>Mus musculus</i>]	173/477 (36%)	247/477 (51%)
AAA62503	glucose transporter-3 [<i>Rattus norvegicus</i>]	174/477 (36%)	246/477 (51%)
Q07647	solute carrier family 2 (facilitated)	174/477 (36%)	246/477 (51%)
NP_035531	solute carrier family 2 (facilitated)	172/477 (36%)	247/477 (51%)
NP_001009770	glucose transporter type 3 [<i>Ovis aries</i>]	170/474 (35%)	246/474 (51%)

Innerhalb der Proteinsequenz von GpHXT1p befindet sich ein bei Zuckertransportern konservierter Bereich von 461 AS Länge (siehe Abb. 46).

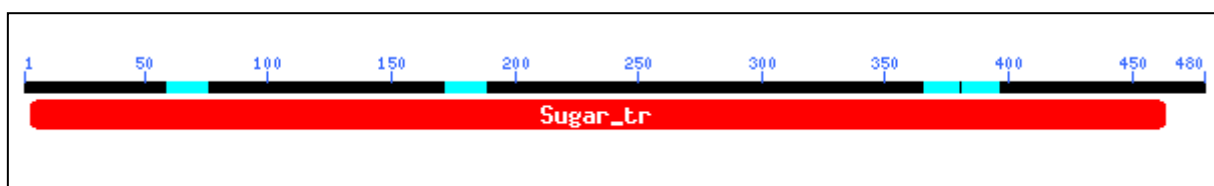


Abb. 46: Konservierter Bereich innerhalb des aus der Plasmidinsert-Sequenz von HMY13-S12 abgeleiteten ORF 2 (480 AS). Die konservierte Sequenz hat eine Länge von 461 AS und ist charakteristisch für Zuckertransporter. Dieses Resultat wurde unter Verwendung der „NCBI conserved domain search“ erhalten (Automatische Funktion der NCBI-BLASTP-Analyse).

Die Analyse des Plasmidinserts aus dem EBY VW4000-Klon HMY13-S12 zeigte, dass es gelungen war aus *Geosiphon pyriformis* die cDNA-Sequenz eines Hexosetransportproteins zu isolieren. Dieser Transporter wird im Folgenden mit GpHXT1p für das Protein bzw. mit *Gphxt1* für das Gen bezeichnet.

Für die viele Transportproteine charakteristisch sind 11 bis 12 hydrophobe Segmente in der Aminosäuresequenz. Diese hydrophoben Bereiche sind in Form von Transmembran-Helices in der Zellmembran angeordnet und durch hydrophile Sequenzabschnitte miteinander verbunden. Es wurde vermutet, dass sich solche Transmembran-Bereiche auch in der Aminosäuresequenz von GpHXT1p befinden. Um dies zu untersuchen, wurden die Aminosäuresequenzen der drei in *Gphxt1* identifizierten ORFs mit der Software „TMHMM Server v.2.0“ analysiert, das Ergebnis ist in Abb. 47 und Tabelle 10 gezeigt.

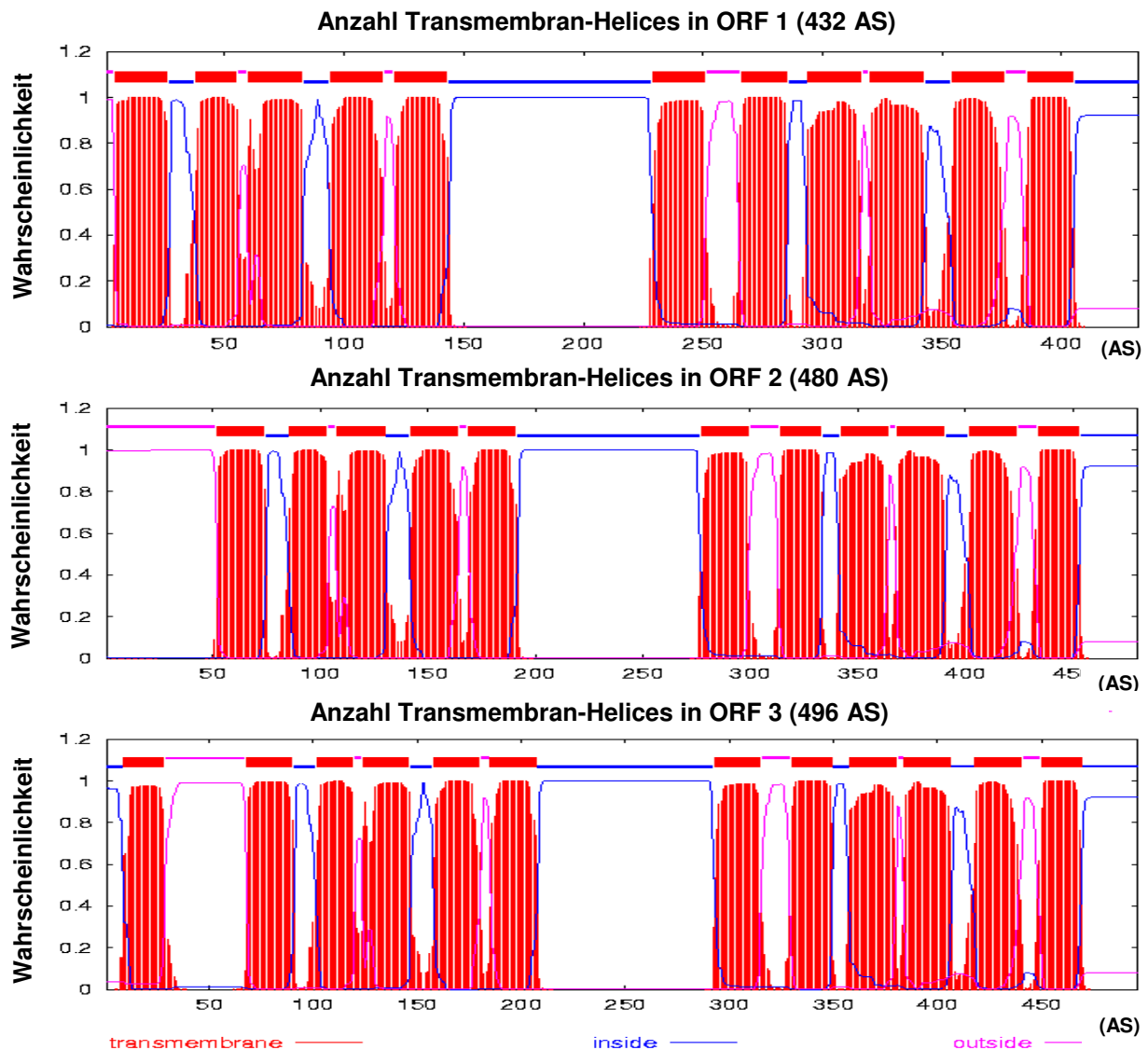


Abb. 47: Untersuchung der Aminosäuresequenz des Zuckertransporters GpHXT1p von *Geosiphon* auf hydrophobe Sequenzabschnitte, so genannte Transmembran-Helices. Folgende Abschnitte wurden untersucht: ORF 1 (432 AS), ORF 2 (480 AS) und ORF 3 (496 AS). Zur Analyse wurde die online verfügbare Software „TMHMM server v. 2.0“ verwendet. Für die ersten beiden ORFs wurden elf Transmembran-Helices vorhergesagt. Für ORF 3 wurde im N-terminalen Bereich eine zusätzliche, zwölfte Helix vorhergesagt.

Tabelle 10: Anzahl und Lage der Transmembran-Helices in den Aminosäuresequenzen dreier putativer ORFs von GpHXT1p.

ORF1 (432 AS)	Position (AS)	ORF 2 (480 AS)	Position (AS)	“ORF” 3 (496 AS)	Position (AS)
-	-	-	-	N-Terminus (inside)	1-8
-	-	-	-	TM Helix 1	9-28
N-Terminus (outside)	1-3	N-Terminus (outside)	1-51	outside 1	29-67
TM Helix 1	4-26	TM Helix 1	52-74	TM Helix 2	68-90
inside 1	27-37	inside 1	75-85	inside 1	91-101
TM Helix 2	38-55	TM Helix 2	86-103	TM Helix 3	102-119
outside 2	56-59	outside 1	104-107	outside 2	120-123
TM Helix 3	60-82	TM Helix 3	108-130	TM Helix 4	124-146
inside 2	83-93	inside 2	131-141	inside 2	147-157
TM Helix 4	94-116	TM Helix 4	142-164	TM Helix 5	158-180
outside 2	117-120	outside 2	165-168	outside 3	181-184
TM Helix 5	121-143	TM Helix 5	169-191	TM Helix 6	185-207
inside 3	144-228	inside 3	192-276	inside 3	208-292
TM Helix 6	229-251	TM Helix 6	277-299	TM Helix 7	293-315
outside 3	252-265	outside 3	300-313	outside 4	316-329
TM Helix 7	266-285	TM Helix 7	314-333	TM Helix 8	330-349
inside 4	286-293	inside 4	334-341	inside 4	350-357
TM Helix 8	294-316	TM Helix 8	342-364	TM Helix 9	358-380
outside 4	317-319	outside 4	365-367	outside 5	381-383
TM Helix 9	320-342	TM Helix 9	368-390	TM Helix 10	384-406
inside 5	343-353	inside 5	391-401	inside 5	407-417
TM Helix 10	354-376	TM Helix 10	402-424	TM Helix 11	418-440
outside 5	377-385	outside 5	425-433	outside 6	441-449
TM Helix 11	386-405	TM Helix 11	434-453	TM Helix 12	450-469
C-Terminus (inside)	406-432	C-Terminus (inside)	454-480	C-Terminus (inside)	470-496

Wie sich auf Abb. 47 erkennen lässt, wurden für ORF 1 und ORF 2 jeweils 11 Transmembran-Helices vorhergesagt. Für die Sequenz des ORF 3 wurden 12 Helices vorhergesagt, die zusätzliche zwölfte Helix liegt im N-terminalen Bereich des Proteins. Die Aminosäuresequenz des ORF 3 besitzt kein Startcodon, bei dem für die Sequenz des ORF 1 vorhergesagten Protein wäre der N-Terminus mit einer Länge von 3 AS relativ kurz. Aus diesen Gründen wurde zunächst das für ORF 2 vorhergesagte Protein mit 11 Transmembran-Helices (siehe Abb. 48) als eine mögliche Struktur von HXT1p angesehen.

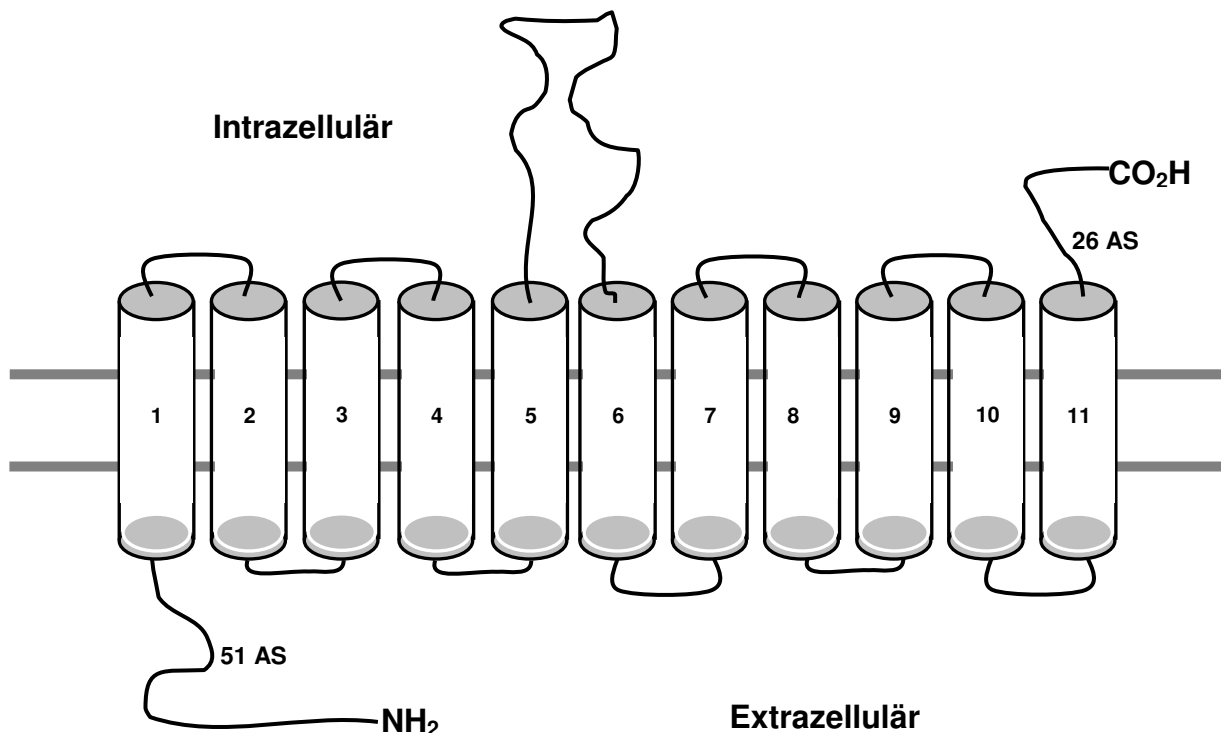


Abb. 48: Schematische Darstellung einer möglichen Struktur des putativen Zuckertransporters GpHXT1p aus *Geosiphon pyriformis*, abgeleitet aus der AS-Sequenz von ORF2. Gezeigt ist, wie die 11 Transmembran-Helices in der Zellmembran angeordnet sein könnten. Der N-Terminus mit einer Länge von 51 AS liegt bei diesem Modell im extrazellulären Raum, der C-Terminus mit einer Länge von 26 AS liegt hingegen im Zytoplasma. Im Unterschied dazu wären bei dem für die Aminosäuresequenz des für ORF 3 vorhergesagten Modells mit 12 Helices beide End-Termini jeweils auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran lokalisiert.

3.2.2.5 Phylogenetische Analyse von GpHXT1p

Die phylogenetische Stellung des putativen Zuckertransporters GpHXT1p aus *Geosiphon* wurde untersucht. Dazu wurde die 496 AS lange Aminosäuresequenz des ORF 3 (siehe **3.2.2.4**) mittels BLASTP und psiBLAST untersucht. Die 130 besten „Hits“ waren Sequenzen von Zuckertransportern. Mit den Sequenzen dieser Transporter und der Sequenz von GpHXT1p wurde ein Alignment erstellt. Aus diesem wurden phylogenetische Stammbäume erstellt. Die Berechnung der Verwandtschaftsbeziehungen der Sequenzen zueinander wurde mit einer „maximum-likelihood“-Methode ermittelt. Der gesamte Stammbaum ist in Abb. 49 gezeigt. Ein vergrößerter Ausschnitt daraus ist in Abb. 50 abgebildet und zeigt GpHXT1p zusammen mit den sieben am nächsten verwandten Proteinen.

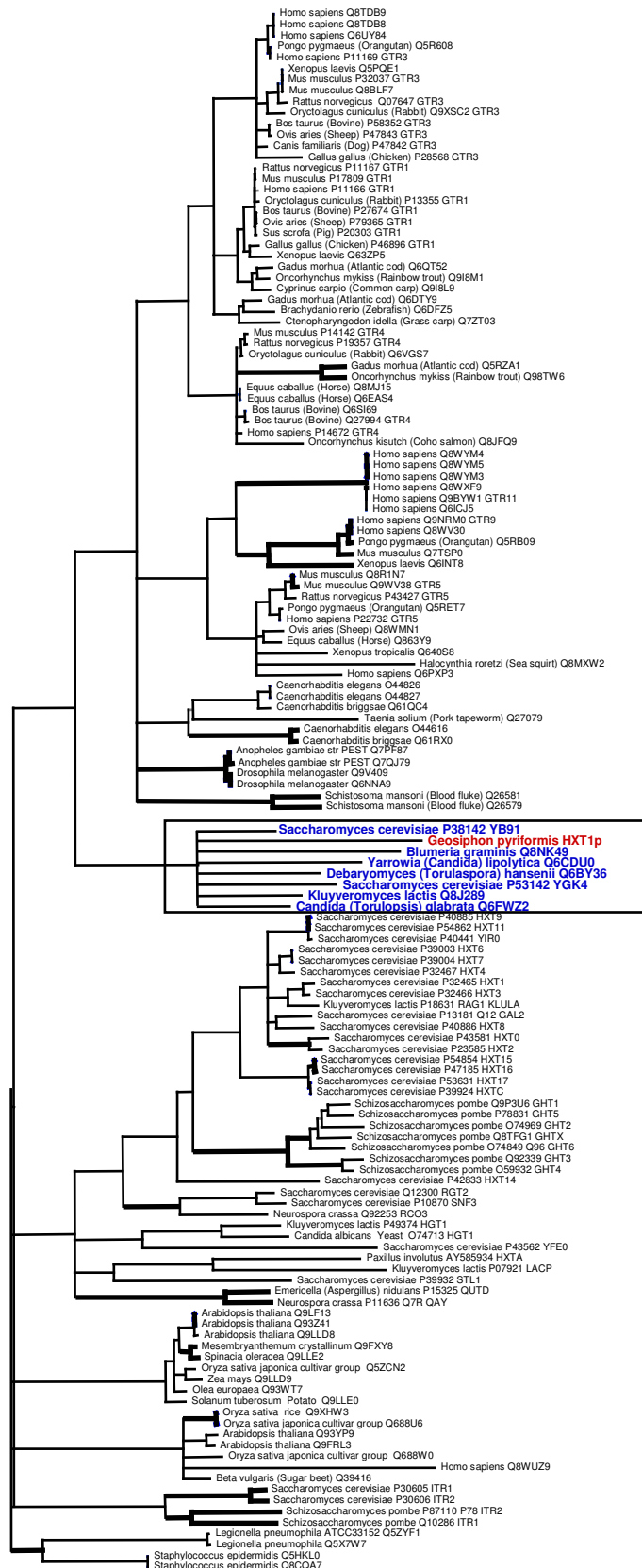


Abb. 49: Phylogenetischer Stammbaum von GpHXT1p. Dargestellt sind die Verwandtschaften von 130 Zuckertransporter-Sequenzen welche die besten „Hits“ bei der BLAST-Analyse ergaben. Der eingerahmte Ausschnitt ist in Abb. 50 vergrößert dargestellt.

Der Stammbaum in Abb. 50 zeigt, dass GpHXT1p mit den Aminosäuresequenzen von putativen, noch nicht funktionell charakterisierten Zuckertransportern verschiedener Ascomyceten am nächsten verwandt ist.

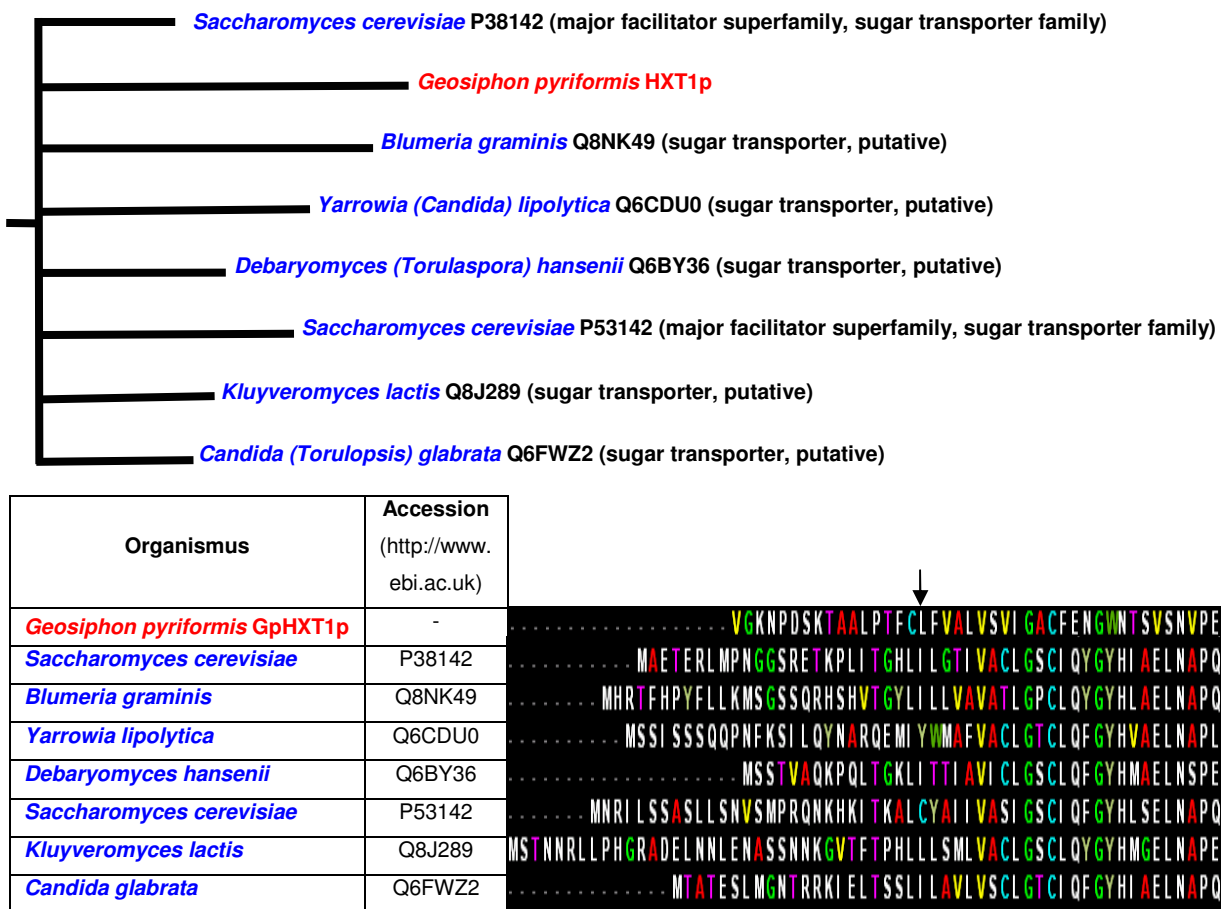


Abb. 50: Ausschnitt aus dem phylogenetischen Stammbaum von GpHXT1p und Teil-Alignment der verwandten Aminosäuresequenzen. Er zeigt die Verwandtschaft von GpHXT1p mit den Aminosäuresequenzen von Zuckertransportern diverser Ascomyceten. Von den jeweiligen Sequenzen sind die ersten 60 Aminosäuren im Alignment neben der Tabelle abgebildet. Der Pfeil markiert die dem putativen Startcodon TTG von ORF 2 entsprechende Aminosäure Leucin.

Das Alignment der Proteinsequenzen in Abb. 50 zeigt, dass die Übereinstimmungen von GpHXT1p mit den Sequenzen der Ascomyceten erst stromabwärts vom putativen Startcodon beginnen. Der 16 Aminosäuren lange Bereich stromaufwärts dagegen zeigt keine erkennbare Homologie zu den anderen Sequenzen, wobei dieser Bereich generell schlecht zu alignen ist.

3.3 Physiologische und molekulare Charakterisierung des putativen Zuckertransporters GpHXT1p von *Geosiphon pyriformis*

Durch funktionelle Komplementation der Hefemutante EBY VW4000 mit Plasmiden der cDNA-Bank von *Geosiphon* war es gelungen, die cDNA-Sequenz des putativen Zuckertransporters GpHXT1p zu isolieren. Ziel der physiologischen Charakterisierung von GpHXT1p war es, Informationen über Substratspezifität, Transportmechanismus, und Aufnahmekinetik von GpHXT1p zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde *Gphxt1* in den heterologen Systemen Hefe und *Xenopus*-Oozyten exprimiert. In einem weiteren Experiment sollte überprüft werden, ob die Expression von *Gphxt1* im Licht bzw. im Dunkeln reguliert ist. Dazu wurde die polyA-RNA von im Licht bzw. im Dunkeln inkubierten *Geosiphon*-Blasen mit einer RT-PCR und *Gphxt1*-spezifischen Primern analysiert.

3.3.1 Untersuchung der Substratspezifität von GpHXT1p

Die Hefemutante EBY VW4000 ist aufgrund mehrerer Mutationen in den Genen für Zuckertransportproteine nicht in der Lage Hexosen aufzunehmen. Der mit *Gphxt1* transformierte EBY VW4000-Klon HMY13-S12 war auf Selektivmedium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle gewachsen. Um Informationen über das Substratspektrum von GpHXT1p zu erhalten, wurde untersucht, ob diese Mutante auch auf Medien mit anderen Zuckern wachsen konnte. Ein unterschiedliches Wachstumsverhalten auf verschiedenen Kohlenstoffquellen könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese Substrate von GpHXT1p unterschiedlich gut transportiert werden. Ob einige der Substrate über GpHXT1p zwar aufgenommen, anschließend aber nicht metabolisiert wurden, konnte anhand der Resultate dieser Experimente nicht beurteilt werden.

3.3.1.1 Untersuchung der Substratspezifität von GpHXT1p: Wachstumstests mit transformierten Hefen auf Agarmedien

Für diese Wachstumstests wurde der Klon HMY13-S12 auf Agarmedien mit verschiedenen Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle plattiert. Zur Kontrolle wurde der Klon auf Medien mit Pentosen, Disacchariden, und Zuckerderivaten plattiert. Alle zugesetzten Zucker bzw. deren Derivate wurden mit einer Endkonzentration von 22 mM eingesetzt. In Abb. 51 ist jeweils ein repräsentativer Ausschnitt aus den Agarplatten gezeigt.

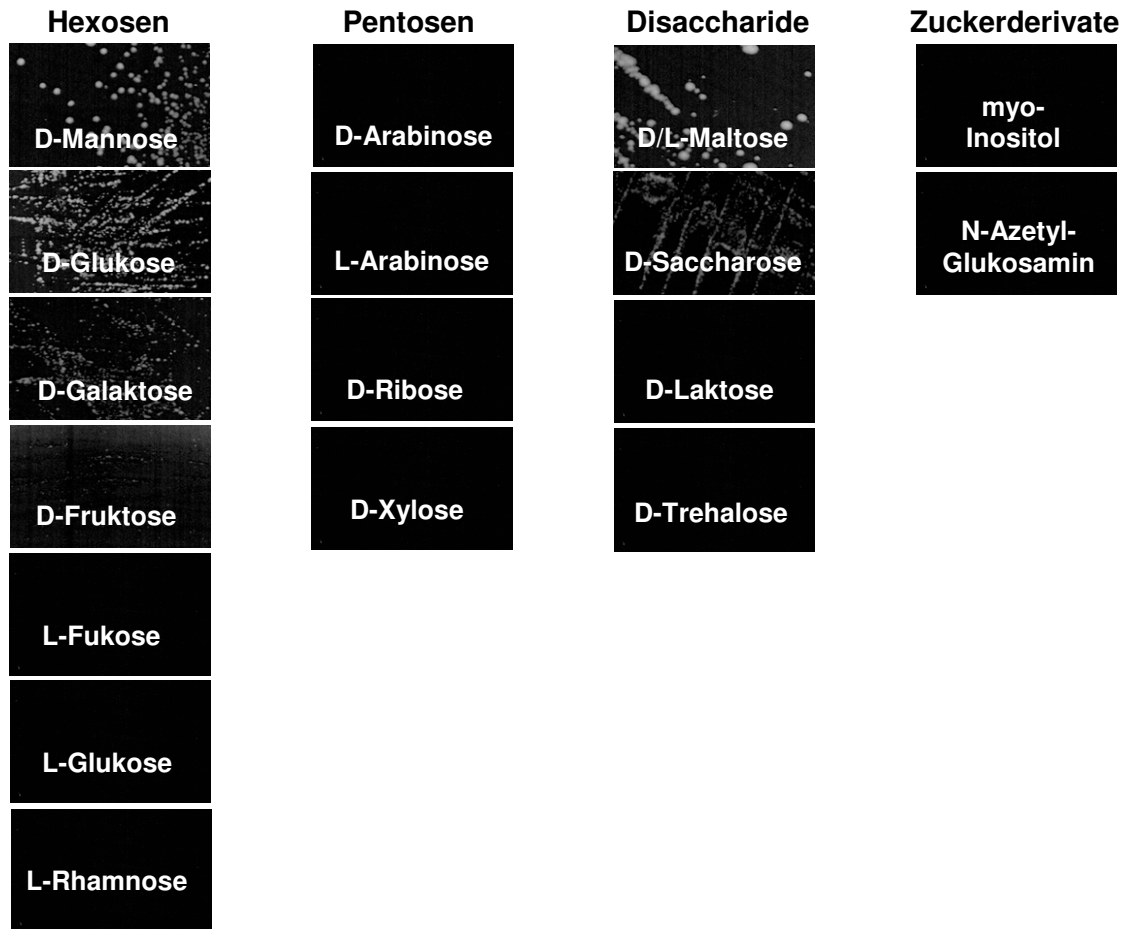


Abb. 51: Wachstumstests zur Untersuchung der Substratspezifität von GpHXT1p. Gezeigt sind jeweils repräsentative Ausschnitte von 1x2 cm Größe aus den Agarplatten. Der mit *Gphxt1* transformierte EBY VW4000-Klon HMY13-S12 wurde auf verschiedene Agarmedien plattiert. Diese enthielten jeweils 22 mM eines bestimmten Zuckers bzw. eines Zuckerderivates als einziger Kohlenstoffquelle. Die Platten wurden nach 4 Tagen Inkubation bei 29° C dokumentiert. Wie zu erkennen ist, war der Klon auf einigen Hexosen mit sehr unterschiedlicher Koloniegröße gewachsen. Auf einer weiteren Gruppe von Hexosen war kein Wachstum zu beobachten. Bei den Kontrollplatten mit Disacchariden, Pentosen und Zuckerderivaten waren nur mit D/L-Maltose und D-Saccharose Kolonien gewachsen. Auf allen anderen Kontrollplatten war dagegen kein Wachstum erfolgt.

Wie man auf Abb. 51 erkennen kann, resultierte das Wachstum auf Hexosen in verschiedenen Koloniegrößen:

D-Mannose > D-Glukose >> D-Galaktose > D-Fruktose.

Auf Fruktose wurden nur sehr kleine Kolonien gebildet. Kein Wachstum erfolgte auf L-Glukose, L-Fukose und L-Rhamnose sowie auf allen Pentosen und Zuckerderivaten. Auf den Platten mit Disacchariden war nur auf Maltose und Saccharose Wachstum möglich. Dieses war dabei auf Saccharose war dabei schwächer als auf Maltose.

In einem weiteren Wachstumstest sollte untersucht werden, ob die Wachstumsfähigkeit des Klones HMY13-S12 auf Hexosen tatsächlich auf Transformation mit *Gphxt1* zurückzuführen

ist. Dazu wurde HMY13-S12 auf Agarmedien mit verschiedenen Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle plattiert. Als Negativkontrolle wurde auf jede der Platten, parallel zu HMY13-S12, der mit dem Vektor pDR196SFI-K (pDR196SFI mit Kontrollinsert, siehe **2.11.19.5**) transfizierte EBY VW4000-Klon HMY14-1 plattiert. Als Positivkontrolle wurde bei einer der Plattierungen statt einer Hexose das Disaccharid Maltose verwendet. Das Ergebnis dieses Wachstumstests ist in Abb. 52 gezeigt

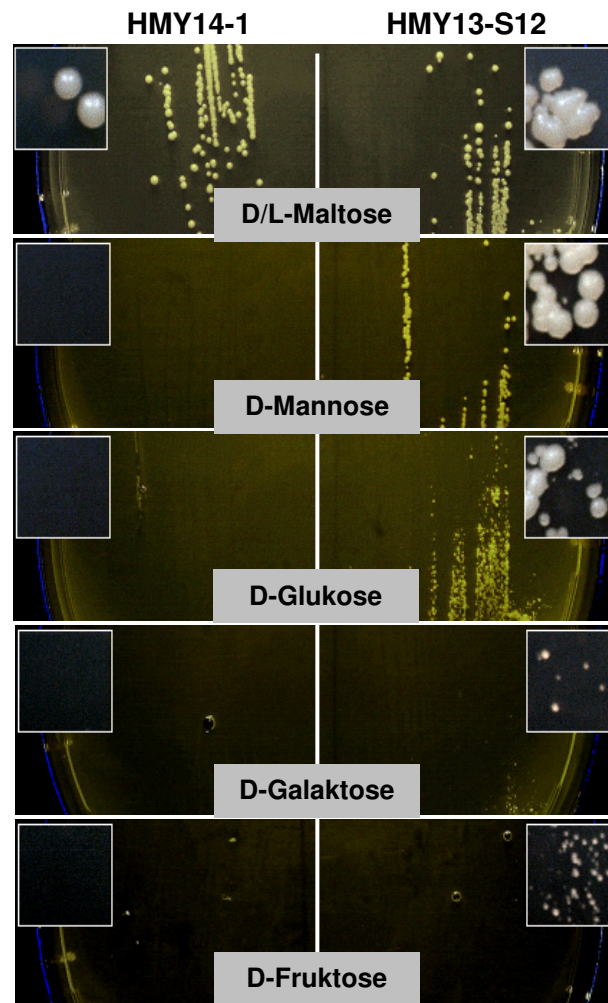


Abb. 52: Wachstumstest mit Negativkontrolle zur Untersuchung der Substratspezifität von GpHXT1p. Der mit *Gphxt1* transformierte EBY VW4000-Klon HMY13-S12 (rechte Seite) wurde auf verschiedene Agarmedien plattiert. Die Medien enthielten jeweils 22 mM des jeweiligen Zuckers als einziger Kohlenstoffquelle. Als Negativkontrolle wurde parallel der mit dem Kontrollvektor pDR196SFI-K transformierte EBY VW4000-Klon HMY14-1 plattiert (linke Seite). Die Platten (Ø 12 cm) wurden nach drei Tagen Inkubation bei 29° C dokumentiert. Die in den linken bzw. rechten oberen Ecken der Abbildung einer Platte befindlichen Ausschnitte (3x3 mm) zeigen die Kolonien etwa in Originalgröße.

Wie auf Abb. 52 zu erkennen ist, war der Klon HMY14-1 auf Maltose sehr gut, auf den Platten mit Hexosen jedoch nicht gewachsen. Der mit *Gphxt1* komplementierte Klon HMY13-S12 war auf Maltose und allen bei diesem Test verwendeten Hexosen gewachsen.

Wie bereits im ersten Wachstumstest resultierte das Wachstum von HMY13-S12 auf Hexosen in verschiedenen Koloniegrößen:

D-Mannose > D-Glukose >> D-Galaktose > D-Fruktose

3.3.1.2 Untersuchung der Substratspezifität von GpHXT1p: Wachstumstests mit transformierten Hefen in Flüssigmedien

Für diese weiteren Wachstumstests wurden von dem EBY VW4000-Klon HMY13-S12 Flüssigkulturen in Mikrotiterplatten angelegt. Die verwendeten Medien enthielten D-Hexosen in verschiedenen Konzentrationen als einzige Kohlenstoffquelle. Die Kulturen wurden bei 29°C auf einem Schüttler für 14 h inkubiert, und die OD₆₀₀-Werte in regelmäßigen Zeitabständen gemessen. Für Mannose und Glukose sind die so erhaltenen Wachstumsraten in Abb. 53, für Galaktose und Fruktose in Abb. 54 gezeigt.

Anhand der Diagramme erkennt man, dass die Höhen der Wachstumsraten von der Konzentration des im Medium vorhandenen Zuckers abhängig waren. Vergleicht man die Diagramme der Inkubationen, mit den Zuckern Mannose, Glukose und Galaktose miteinander, so erkennt man dass die Veränderung der Wachstumsraten in ähnlichen Konzentrationsbereichen stattfindet. Bei Konzentrationen unter 2,5 mM war kein Wachstum der Kulturen zu beobachten. Ab etwa 2,5 bis 25 mM stieg die Wachstumsrate bei allen drei Zuckern konzentrationsabhängig an; eine weitere Erhöhung der Konzentration von 25 auf 50 mM führte zu keinem weiteren Anstieg der Wachstumsrate. Nach 14 Stunden Inkubation erreichten die Kulturen mit der Konzentration 25 mM ungefähr die folgenden OD₆₀₀-Werte: Mannose: 0,5; Glukose: 0,45; Galaktose: 0,33.

Ein zu den vorhergehenden Zuckern abweichendes Wachstumsverhalten, zeigte sich bei der Inkubation mit Fruktose. Bei Konzentrationen bis zu 10 mM war kein Wachstum zu beobachten. Der Bereich des konzentrationsabhängigen Anstiegs der Wachstumsraten lag zwischen etwa 10 und 150 mM. Eine weitere Erhöhung der Konzentration auf 200 mM führte zu keinem weiteren Anstieg der Wachstumsrate. Nach 14 Stunden Inkubation erreichte die Kultur mit 150 mM eine OD₆₀₀ von etwa 0,42.

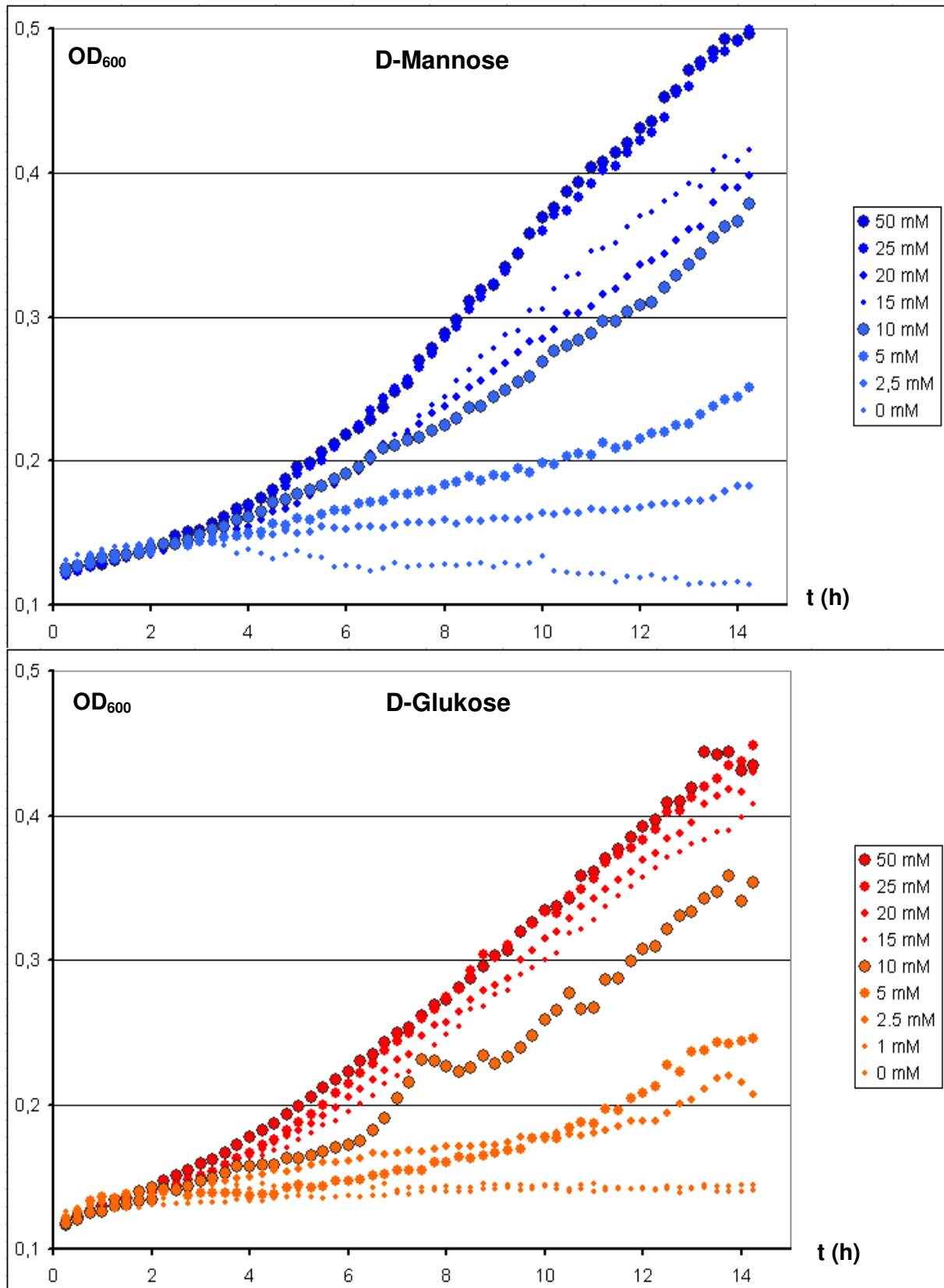


Abb. 53: Wachstumstests in Flüssigmedien zur Untersuchung der Substratspezifität von GpHXT1p. Der mit *Gphxt1* transformierte EBY VW4000-Klon HMY13-S12 wurde in Flüssigmedien mit verschiedenen Konzentrationen Mannose und Glukose inkubiert. In regelmäßigen Zeitabständen wurde die OD₆₀₀ der Kultur gemessen. Zu erkennen ist, dass die Höhe der Wachstumsrate von der angebotenen Konzentration des jeweiligen Zuckers abhängig ist.

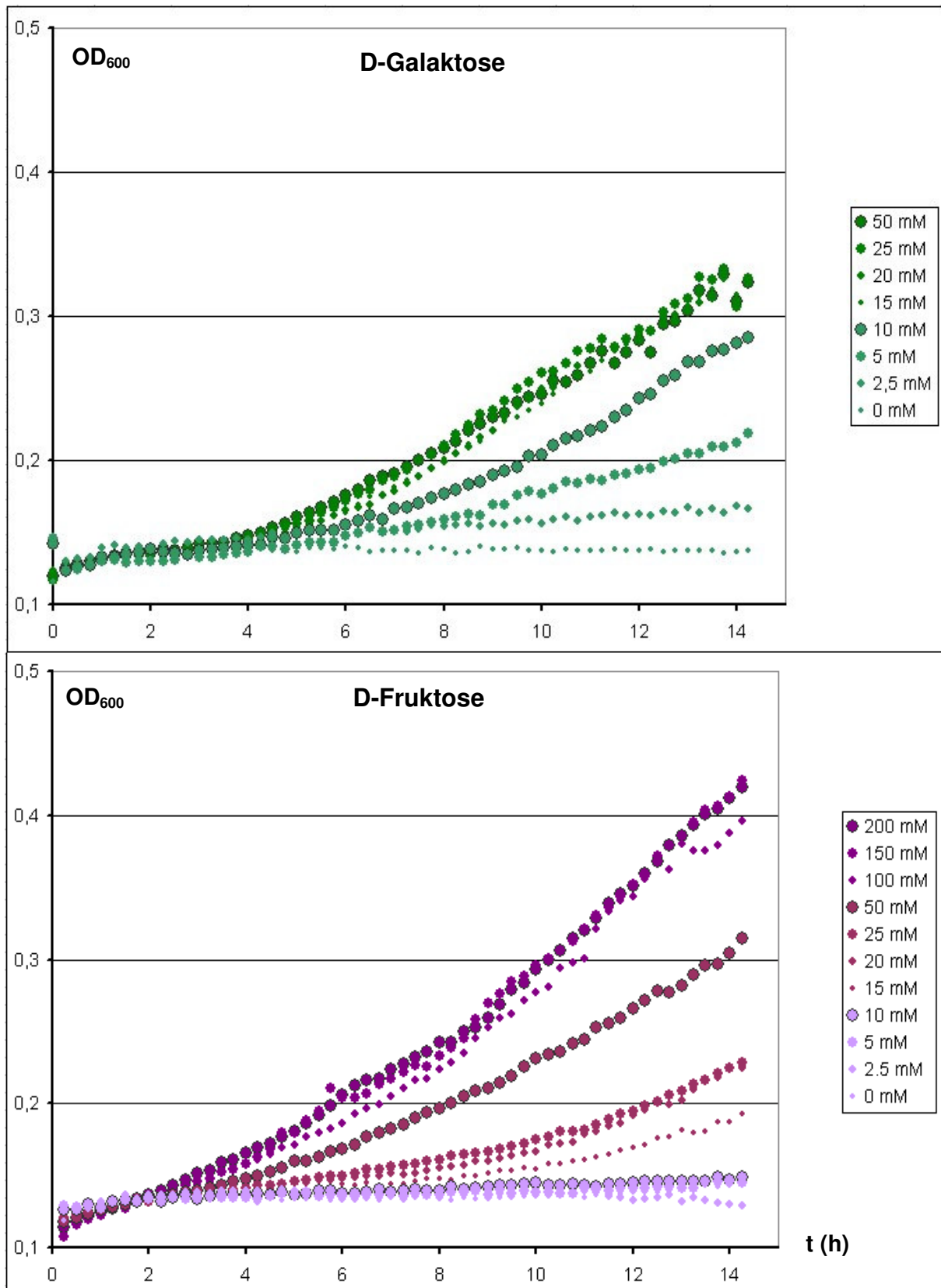


Abb. 54: Wachstumstests in Flüssigmedien zur Untersuchung der Substratspezifität von GpHXT1p. Der mit *Gphxt1* transformierte EBY VW4000-Klon HMY13-S12 wurde in Flüssigmedien mit verschiedenen Konzentrationen Galaktose und Fruktose inkubiert. In regelmäßigen Zeitabständen wurde die OD₆₀₀ der Kultur gemessen. Zu erkennen ist, dass die Höhe der Wachstumsrate von der angebotenen Konzentration des jeweiligen Zuckers abhängig ist.

Wie in den vorhergehenden Wachstumstests erfolgte das Wachstum von HMY13-S12 bei 25 mM Substratkonzentration in unterschiedlicher Stärke:

D-Mannose > D-Glukose >> D-Galaktose > D-Fruktose

Allerdings führte eine Erhöhung der Fruktosekonzentration auf Werte über 50 mM zu einem stärkeren Wachstum als bei Galaktose. Bei 150 mM Fruktose ist das Wachstum nach 14 h mit einer OD₆₀₀ von ca. 0,42 fast genau so hoch wie bei 25 mM Glukose. Bei den drei anderen Substraten führte eine Erhöhung der Konzentration über 25 mM zu keinem weiteren Anstieg der Wachstumsrate. Bei einer hypothetischen Konzentration von jeweils 100-150 mM wachsen die Kulturen in folgenden Stärken:

D-Mannose > D-Glukose > D-Fruktose >> D-Galaktose

3.3.2 Untersuchung zum Einfluss von Licht auf die Expression von *Gphxt1*

Es wurde untersucht, ob *Gphxt1* in *Geosiphon pyriformis* im Licht stärker als im Dunkeln exprimiert wird. Dazu wurden Blasen von *Geosiphon* unterschiedlich lange im Licht oder im Dunkeln inkubiert. Aus der isolierten polyA-RNA dieser Proben wurde cDNA hergestellt. Diese wurde als Template für eine semiquantitative PCR mit *Gphxt1*-spezifischen Primern eingesetzt. Die Anzahl der PCR-Zyklen wurde so niedrig wie möglich gewählt, um nicht in den Sättigungsbereich der PCR-Amplifikation zu gelangen. Eine verstärkte Expression von *Gphxt1* unter Lichteinfluss sollte sich in unterschiedlichen Mengen an cDNA in den Proben niederschlagen. Solche unterschiedlichen Templatekonzentrationen sollten nach der PCR auf dem Agarosegel als verschieden starke Banden sichtbar werden. Konzentrationsunterschiede in der Template-cDNA, die nicht auf Expressionsregulation zurückzuführen sind, sollten durch die PCR-Amplifikation der cDNA eines Kontrollgens unter gleichen Bedingungen identifiziert werden. Zu diesem Zweck wurden Primer für die cDNA des Elongationsfaktors *EF-1α* aus *Geosiphon* verwendet, da von diesem Gen eine gleichmäßige Expression im Licht und im Dunkeln angenommen wurde. Um die Ergebnisse der PCR-Ansätze semiquantitativ miteinander vergleichen zu können, wurde die Helligkeitsintensität der Banden auf dem Agarosegel mit der Software „ImageJ“ gemessen. Die Werte für die beiden PCR-Ansätze wurden als Blockdiagramm dargestellt. Die Werte für *Gphxt1* wurden durch Division mit den Werten von *EF-1α* normiert. Die Ergebnisse der Agarosegelanalyse und deren Auswertung ist in Abb. 55 dargestellt.

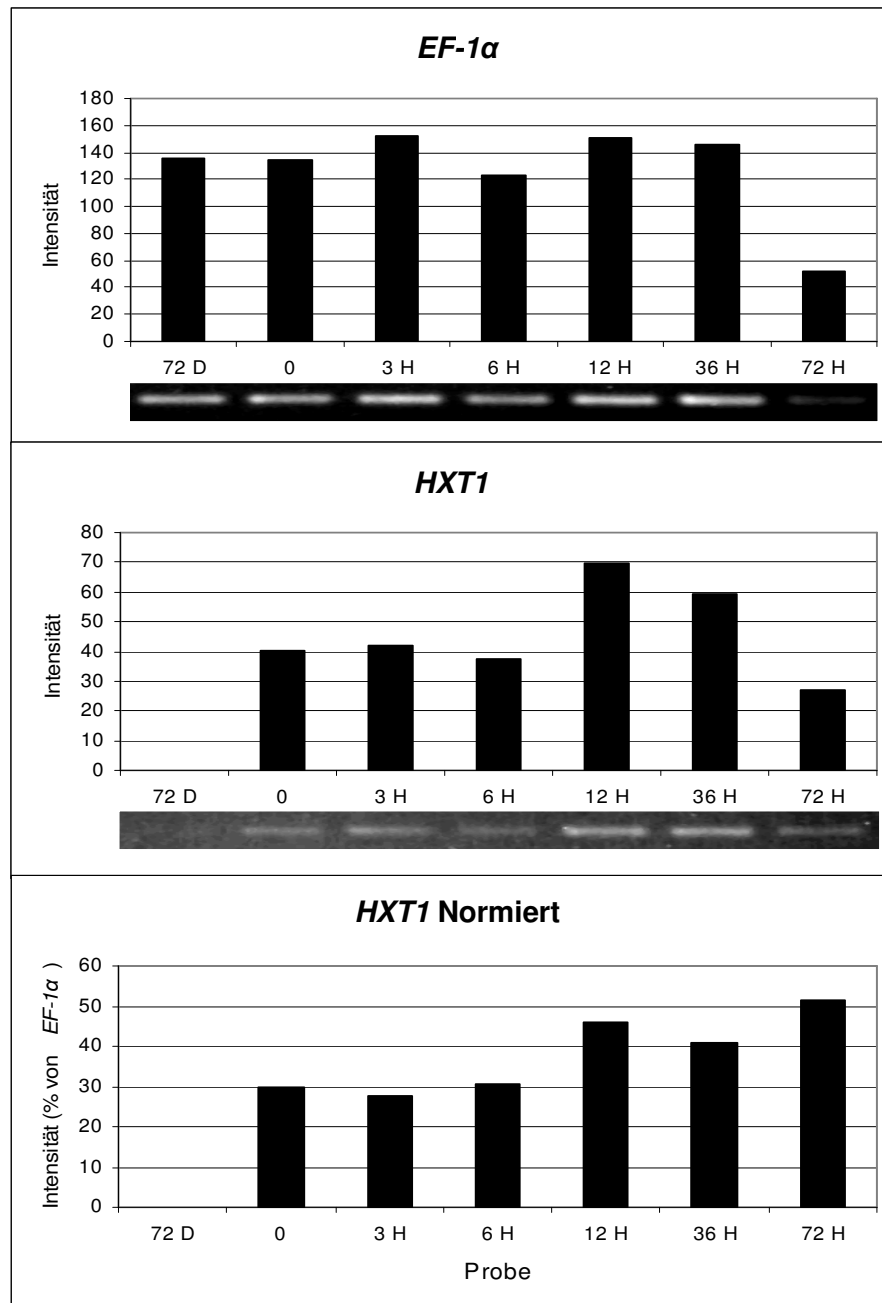


Abb. 55: Untersuchung zum Einfluss von Licht auf die Expression von *Gphxt1*. Als Template diente cDNA aus *Geosiphon*-Blasen, welche zuvor verschieden lange im Licht oder im Dunkeln inkubiert wurden. Gezeigt ist die Auswertung von den Agarosegelen der PCR-Ansätze mit Primern für *Gphxt1* bzw. für den Elongationsfaktor *EF-1α*. Die PCR mit den *EF-1α*-Primern diente zur Überprüfung der Templatekonzentrationen in den Ansätzen. Die Helligkeitsintensität der Banden wurde mit der Software „ImageJ“ gemessen und als Blockdiagramm (n = 1) dargestellt. Die Werte für *Gphxt1* wurden durch Division mit den Werten von *EF-1α* normiert und als %-Anteile von *EF-1α* dargestellt. Unter den Blockdiagrammen angegeben in der PCR verwendeten cDNA-Templates aus entsprechend inkubierten *Geosiphon*-Blasen: 72 D = 72 h Dunkelinkubation; 0 = cDNA aus *Geosiphon*-Blasen welche unmittelbar vor Beginn der Lichtphase des normalen Tag/Nachtrhythmus entnommen wurden; 3 H = 3 h Lichtinkubation wurden; 12 H = 12 h Lichtinkubation; 36 H = 36 h im Lichtinkubation; 72 H = 72 h Lichtinkubation.

Wie in Abb. 55 zu erkennen ist, zeigten die Banden der PCR mit *EF-1 α* , bis auf eine Ausnahme, etwa die gleiche Intensität. Lediglich die Probe mit cDNA aus der 72 h-Lichtinkubation zeigte eine deutlich geringere Intensität. Bei der Intensität der Banden für *Gphxt1* zeigten die Licht inkubierten Proben mit zunehmender Lichtdauer einen Anstieg. Die Dunkelprobe hingegen zeigte nur eine sehr geringe Intensität. Von der Nullstundeninkubation bis zur 6 h-Lichtinkubation schwankte die Intensität nur gering. Die Werte der 12 und 36 h-Lichtinkubation waren dagegen höher. Der Wert der 72 h-Lichtinkubation war niedriger und lag unter dem Wert der Nullstundeninkubation. Nach der Normierung ergab sich ein ähnliches Bild, möglicherweise lässt sich eine leichte Tendenz zur Erhöhung der Expression von *Gphxt1* mit zunehmender Lichtdauer erkennen. In der Probe aus der 72 h-Dunkelinkubation war keine *Gphxt1*-cDNA nachweisbar.

3.3.3 pH-Messungen in Hefesuspensionen zur Untersuchung des Transportmechanismus von GpHXT1p

Der Mechanismus des Substrattransportes über GpHXT1p sollte untersucht werden, dafür kommen zwei Mechanismen in Betracht. Der erste ist die erleichterte Diffusion. Der zweite mögliche Mechanismus ist der protonengekoppelte, aktive Substrattransport. Wird ein Substrat protonengekoppelt über GpHXT1p in die Zellen transportiert, so sollte der pH-Wert des Mediums, zumindest kurzfristig alkalischer werden, da ihm Protonen entzogen werden. Wird ein Substrat durch erleichterte Diffusion in die Zellen transportiert, so sollte der pH-Wert des Mediums konstant bleiben. Zunächst wurde der mit *Gphxt1* transformierte EBY VW4000-Klon HMY13-S12 in Flüssigmedium mit 0,1 % Glukose angezogen. Die gewachsene Hefe wurde gewaschen und in destilliertem Wasser resuspendiert. Anschließend wurde mit der pH-Messung begonnen, jede Messung bestand aus insgesamt zwei, bzw. drei Abschnitten: Zunächst wurde der pH-Wert der Suspension für 15 min gemessen, nach dieser Zeitspanne veränderte sich der pH nur noch geringfügig. Dann wurden verschiedene Zucker (oder Wasser) zu der Hefesuspension zugegeben. Anschließend wurde der pH für weitere 15 min gemessen. Nach dieser Zeit hatte sich der pH erneut stabilisiert, sofern Änderungen durch die Zugabe der Testsubstanz erfolgt waren. Im dritten Teil, welcher nicht bei jeder Messung durchgeführt wurde, wurde ein weiterer Zucker (oder Wasser) zugegeben. Danach wurde der pH nochmals für 15 min gemessen. Am Ende einer solchen Messung wurde die Hefe gewaschen, wieder in destilliertem Wasser resuspendiert und für die nächste Messung verwendet. Der mit pDR196SFI-K (pDR196SFI mit Kontrollinsert, siehe **2.11.19.5**) transformierte EBY VW4000-Klon HMY14-1 wurde für Kontrollmessungen nach dem gleichen Schema verwendet. Zuvor war dieser Klon in Flüssigmedium mit 0,1 % Maltose angezogen worden. Die Ergebnisse der pH-Messungen sind in Abb. 56 dargestellt.

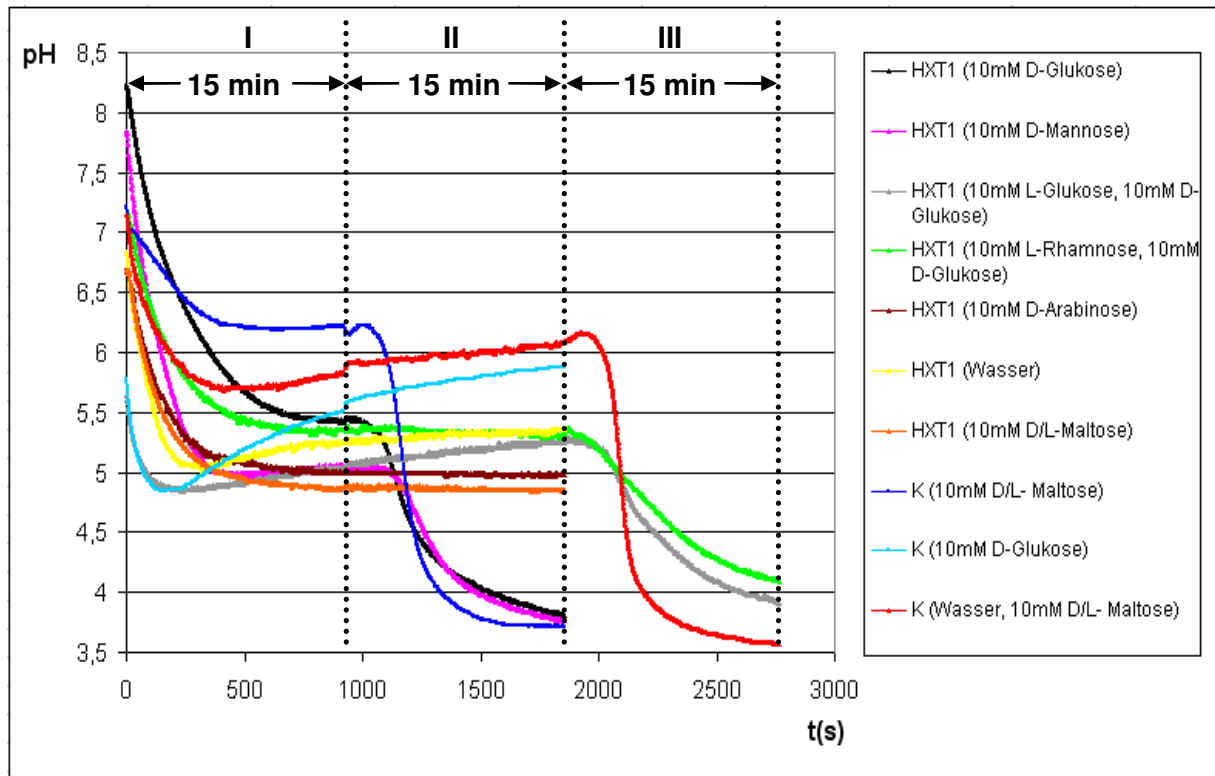


Abb. 56: Untersuchung zum Transportmechanismus von GpHXT1p. Es wurde untersucht, ob sich der pH-Wert einer Suspension eines mit *Gphxt1* transformierten EBY VW4000-Klons änderte, wenn bestimmte Testsubstanzen zugegeben wurden. Gezeigt sind die Ergebnisse der pH-Messungen mit Suspensionen der EBY VW4000-Klone HMY13-S12 (HXT1) und HMY14-1 (mit dem Kontrollvektor pDR196SFI-K transformiert, K). Zur besseren Übersicht sind die Messungen jeweils in drei Abschnitte (I-III) aufgeteilt. **Teil I:** Hier stabilisierte sich der pH innerhalb der 15 Minuten auf Werte zwischen pH 4,8 und 6,2. **Teil II:** Hier wurden verschiedene Zucker (oder Wasser) zur Suspension zugegeben. In den folgenden 15 Minuten bewirkte diese Zugabe, dass der pH entweder saurer wurde oder unverändert blieb. **Teil III:** Hier wurde ein weiterer Zucker (oder Wasser) zugegeben und der pH für weitere 15 Minuten gemessen, dieser Teil wurde jedoch nicht bei allen Messungen durchgeführt. Bei der Messung mit HMY14-1 wurde der pH nach Zugabe von Maltose kurzfristig alkalischer. In der Legende ist angegeben, welche Substanzen bei Teil II bzw. III der Messung zugegeben wurden.

Anhand Abb. 56 wurden die Messungen ausgewertet, zur besseren Übersicht wurden die Ergebnisse für jeden Teil der zwei bzw. dreiteiligen Messungen getrennt dargestellt:

Abschnitt I:

Hier wurde der pH-Wert der Suspension unmittelbar nach dem Resuspendieren jeweils für 15 Minuten ohne Zugabe einer Testsubstanz gemessen

Die pH-Werte des Mediums schwankten zu Beginn aller Messungen um bis zu 2,5 pH-Einheiten und lagen etwa zwischen 5,8 und 8,25. Der pH-Wert, welcher sich nach 15 Minuten (900s) einstellte lag zwischen 4,8 und 6,2.

Abschnitt II:

Hier wurden Zucker zugegeben von denen z.T. angenommen wurde, dass sie von GpHXT1p transportiert werden. Die der Wahl der Zucker orientierte sich an den Ergebnissen aus den Wachstumstests (siehe 3.3.3) mit HMY13-S12 bzw. HMY14-1. Zumindest D-Mannose und D-Glukose sollten von GpHXT1p transportiert werden.

Messungen mit HMY13-S12 (HXT1)

Bei den Messungen nach Zugabe von D-Glukose bzw. D-Mannose fiel der pH des Mediums stark ab und der Wert stabilisierte sich bei etwa 3,75. Bei den Messungen nach Zugabe von L-Glukose, L-Rhamnose, D-Arabinose, Maltose oder Wasser wurde keine Veränderung des pH-Wertes beobachtet.

Messungen mit HMY14-1 (K)

Bei der Messung nach Zugabe von Maltose fiel der pH-Wert des Mediums stark ab und stabilisierte sich bei etwa 3,6. Bei den Messungen nach Zugabe von D-Glukose oder Wasser wurde keine Veränderung des pH-Wertes beobachtet.

Abschnitt III:

Mit diesen Kontrollmessungen sollte die Vitalität der Hefezellen überprüft werden. Hier zugegebene Testsubstanzen hatten in den vorgehenden Messungen bei der entsprechenden Hefesuspension eine pH-Änderung bewirkt.

Messungen mit HMY13-S12 (HXT1)

Bei den Messungen nach Zugabe von L-Glukose bzw. L-Rhamnose in Abschnitt II blieb der pH-Wert jeweils unverändert. Dann wurde jeweils D-Glukose zugegeben. In beiden Fällen fiel der vorher unverändert gebliebene pH-Wert ab und stabilisierte sich bei etwa 4,0.

Messungen mit HMY14-1 (K)

Bei der Messung nach Zugabe von Wasser in Abschnitt II war der pH unverändert geblieben. Bei der Messung nach Zugabe von Maltose stieg der pH Wert zunächst um etwa 0,2 pH-Einheiten an, anschließend fiel der Wert ab und stabilisierte sich etwa bei 3,6.

Somit konnte bei keiner der Messungen mit HMY13-S12 der bei protonengekoppeltem Substrattransport erwartete, kurzfristige Anstieg des pH nach Zugabe der von GpHXT1p transportierten Substrate D-Glukose und D-Mannose beobachtet werden.

Es konnte jedoch beobachtet werden, dass HMY13-S12 auf Maltose nicht mit einer Ansäuerung des Außenmediums reagierte, HMY14-1 dies aber tat. Dies liegt vermutlich daran, dass die Expression der Proteine für den Maltosetransport in Gegenwart von Glukose reprimiert werden. Da HMY13-S12 vor der pH-Messung mit Glukose angezogen wurde, war dieser Effekt zu erwarten. Die Alkalisierung des Mediums von HMY14-1 nach der Maltosegabe zeigt, dass der Maltosetransport in EBY VW4000 protonengekoppelt erfolgt. Diese Messung kann daher als Positivkontrolle gewertet werden.

3.3.4 Potentialmessungen an *Xenopus*-Oozyten zur Untersuchung des Transportmechanismus von GpHXT1p

Bei den pH-Messungen mit Suspensionen von HMY13-S12 ergaben sich keine klaren Hinweise darauf, dass der Substrattransport über GpHXT1p protonengekoppelt erfolgt. Daher wurde versucht, *Gphxt1* in Oozyten von *Xenopus laevis* zu exprimieren, um anschließend Plasmamembran-Potentialmessungen zur weiteren Untersuchung des Transportmechanismus von GpHXT1p durchführen zu können. Während einer Inkubationszeit von drei bis sechs Tagen nach cRNA-Injektion sollte ein funktionelles Transportprotein exprimiert sein und in der Zellmembran vorliegen. Bei einer GpHXT1p exprimierenden Zelle sollte ein Einwärtstransport von Substrat im Symport mit Protonen über GpHXT1p zu einer messbaren Änderung des Membranpotentials führen. Voraussetzung ist das Vorliegen eines Protonengradienten, dieser wurde durch Inkubation der Zellen in saurem Puffer bereitgestellt.

Zunächst wurde die cDNA von *Gphxt1* in den Oozytenexpressionvektor pOO2SFI kloniert. Dieser Vektor ist ein Abkömmling des Vektors pOO2, welcher durch Einfügen von zwei Schnittstellen (*Sfi* IA und *Sfi* IB) für das Restriktionsenzym *Sfi* I in die MCS modifiziert wurde. Die cDNA von *Gphxt1* und Vektor wurden mit *Sfi* I geschnitten und miteinander ligiert. In der DNA-Sequenz von pOO2SFI befindet sich stromabwärts von der MCS, hinter einem polyA-Sequenzabschnitt, die Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Mlu* I. Über diese Schnittstelle wurde der Vektor linearisiert und anschließend als Template zur *in vitro* Synthese von *Gphxt1*-cRNA verwendet. Die synthetisierte cRNA wurde auf einem denaturierenden Agarosegel analysiert, dieses ist in Abb. 57 dargestellt.

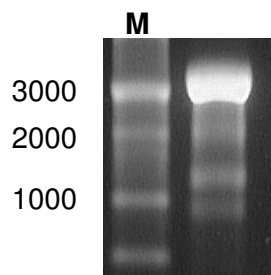


Abb. 57: Analyse der synthetischen cRNA von *Gphxt1* auf einem denaturierenden Agarosegel (M = Marker, Größe in bp). Bei etwa 3000 bp ist das Hauptprodukt zu erkennen. Darunter sind weitere Nebenprodukte mit einer Größe von etwa 2100, 1200 und 900 bp erkennbar.

Auf dem Agarosegel in Abb. 57 kann man ein Hauptprodukt von ca. 3000 bp neben einer Reihe von Nebenprodukten bei etwa 2000, 1200 und 900 bp erkennen. Von dieser cRNA wurden je 50 ng in Oozyten von *Xenopus laevis* injiziert. Nach der Injektion wurden diese Zellen für drei bis sechs Tage bei 17° C gelagert. Ab dem dritten Tag wurden Messungen mit entnommenen Zellen durchgeführt. Dazu wurde eine Zelle in ein Messbad gebracht, welches mit dem jeweils gewünschten Puffer durchströmt wurde (siehe 2.11.21.4.7). Der Wechsel zu

einem anderen Puffer konnte sehr schnell erfolgen. Während die Zelle in verschiedenen Puffern inkubiert wurde, wurde das Membranpotential mit eingestochenen Mikroelektroden gemessen. Parallel dazu wurde, während der gesamten Inkubationszeit, der Verlauf des Membranpotentials mit einem Rechner aufgezeichnet. Nach jedem Pufferwechsel wurde beobachtet, ob dies zu einer Änderung des Membranpotentials führte. Waren Veränderungen aufgetreten, so wurde der nächste Pufferwechsel erst vorgenommen nachdem sich der Wert stabilisiert hatte.

Zu Beginn einer Messung wurde die Zelle im Messbad zunächst im Puffer pH 7,5 inkubiert. Nach der Inkubation in Puffer pH 7,5 folgte ein Wechsel zu Puffer pH 5 ohne Glukose. Dies wurde zum einen durchgeführt um GpHXT1p einen Protonengradienten zur Verfügung zu stellen, zum anderen konnte die Vitalität der gemessenen Zelle an der darauf Folgenden Reaktion des Membranpotentials überprüft werden. Der nächste Wechsel erfolgte zu Puffer pH 5 mit 50 mM Glukose. Nach der Zugabe von Glukose wurden zur Kontrolle, durch Spülen des Bades mit Puffer pH 5 ohne Glukose und dann mit Puffer pH 7,5 jeweils wieder die Zustände vor der Glukosezugabe hergestellt. Insgesamt wurden 40 Zellen gemessen, von diesen zeigten drei eine Reaktion auf Glukose, die restlichen reagierten nicht. Zwei repräsentative Messungen des Membranpotentialverlaufs einer „Reagierenden“ bzw. einer „Nichtreagierenden“ Zelle sind in Abb. 58A bzw. 58B dargestellt.

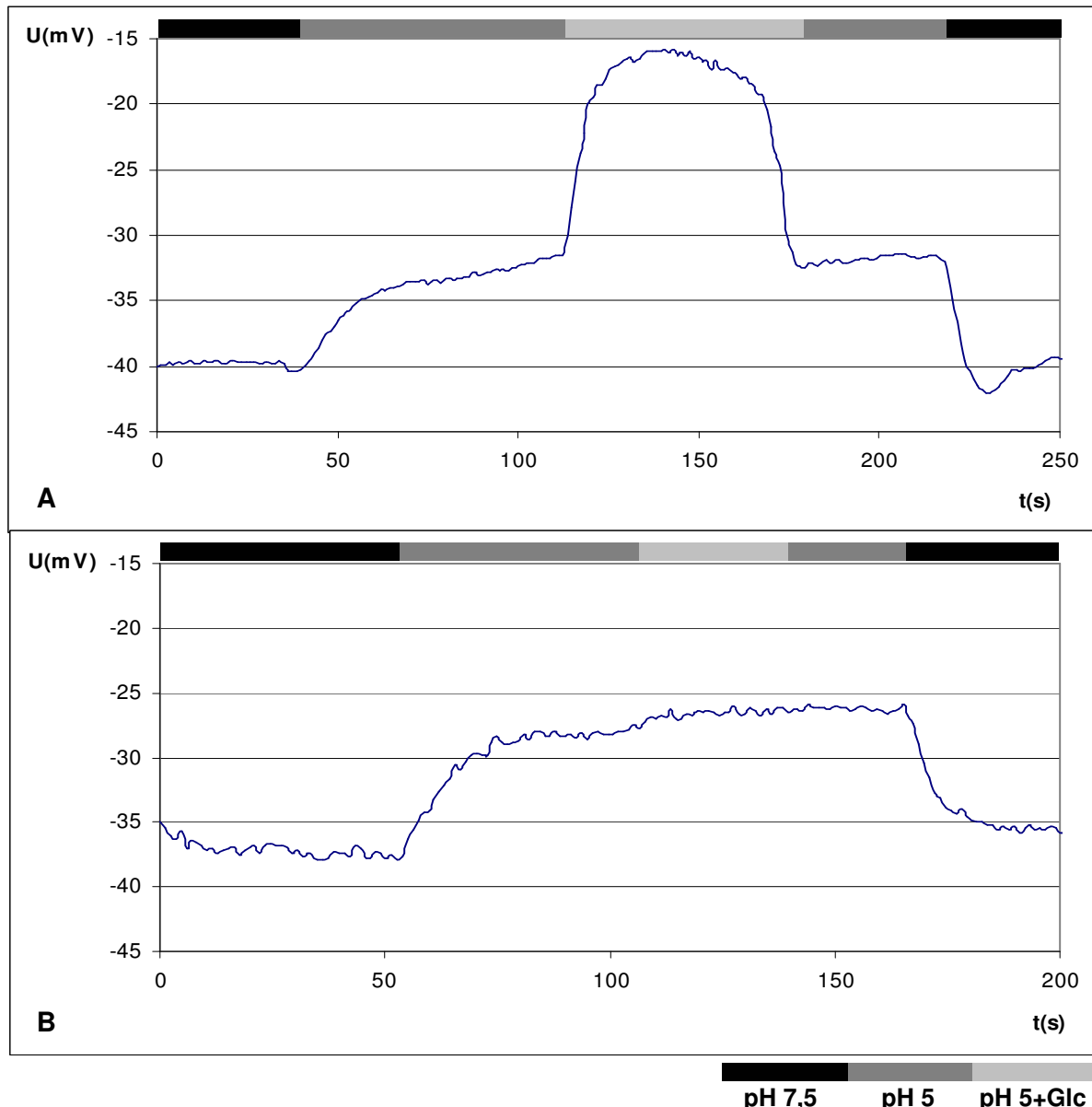


Abb. 58: Untersuchung zum Transportmechanismus von GpHXT1p. Es wurde untersucht ob die Inkubation von mit *Gphxt1*-cRNA injizierten *Xenopus*-Oozyten in saurem Puffer (pH 5) mit Glukose (50 mM) zu einer Beeinflussung des Membranpotentials der Zelle führte. Eine solche Reaktion wurde bei einigen der gemessenen Oozyten beobachtet, viele reagierten jedoch nicht. Gezeigt ist jeweils eine repräsentative Messung des Membranpotentialverlaufs einer „Reagierenden“ (**A**) bzw. „Nichtreagierenden“ Zelle (**B**). Das gemessene Potential wurde jeweils gegen die Inkubationsdauer aufgetragen. Beim Wechsel von Puffer pH 7,5 zu Puffer pH 5 erfolgte bei A und bei B eine Depolarisierung der Zellmembran. Nach dem Wechsel zu Puffer pH 5 mit Glukose zeigte sich nur bei A, nicht jedoch bei B eine weitere Depolarisation der Zellmembran. Danach wurde das Messbad mit den Puffern pH 5 ohne Glukose und pH 7,5 gespült. Dabei wurden jeweils in etwa wieder die gleichen Werte erreicht, die in diesen Puffern vor der Glukosezugabe gemessen wurden.

Auf Abb. 58A lässt sich erkennen, dass das Membranpotential zu Beginn der Messung im neutralen Puffer mit pH 7,5 einen Wert von etwa -40 mV aufwies. Der Wechsel auf den sauren Puffer mit pH 5 war an der Depolarisation der Membran auf ca. -32 mV zu erkennen.

Als Reaktion auf 50 mM Glukose im Messbad erfolgte sehr schnell eine weitere Depolarisation auf ca. -16 mV. Nach Plateaubildung des Potentials und Spülen des Bades mit Puffer pH 5 ohne Glukose repolarisierte die Membran wieder auf etwa -32 mV. Der anschließende Wechsel zu Puffer pH 7,5 bewirkte die weitere Repolarisation auf ca. -40 mV. Dies zeigte, dass die Reaktionen auf pH-Veränderungen und Glukose reversible Effekte waren. Diese Abfolge der Pufferwechsel wurde mit einer Zelle mehrfach hintereinander wiederholt, die entsprechenden Reaktionen der Zelle konnten dabei mehrmals reproduziert werden. Insgesamt wurden 40 mit cRNA injizierte Zellen gemessen, von diesen zeigten drei Zellen die beschriebenen Effekte. Der Membranpotentialverlauf einer Messung mit einer Zelle, welche keine Reaktion auf Glukose im Messbad zeigte, ist in Abb. 58B gezeigt. Der Membranpotentialverlauf einer solchen „nichtreagierenden“ Zelle, war bis auf die ausbleibende Reaktion auf Glukose, in etwa gleich wie der bei einer „reagierenden“ Zelle. Im neutralen Puffer pH 7,5 wies das Membranpotential einen Wert von etwa -37 mV auf. Der Wechsel auf den sauren Puffer pH 5 verursacht eine Depolarisation der Membran auf ca. -28 mV. Bis auf eine leichte Schwankung um 1-2 mV zeigte das Membranpotential anschließend aber keine Reaktion auf die Gegenwart von 50 mM Glukose im Messbad. Das folgende Spülen mit Puffer pH 5 ohne Zucker führte ebenfalls zu keiner Veränderung des Membranpotentials. Der darauf folgende Wechsel zu Puffer pH 7,5 bewirkte eine Repolarisation auf ca. -36 mV. Somit waren auch bei dieser Zelle die Reaktionen des Membranpotentials auf die durch verschiedene Medien verursachten pH-Wechsel ein reversibler Effekt.

Die Messungen mit *Gphxt1*-cRNA injizierten *Xenopus*-Oozyten ergaben somit Hinweise, dass der Substrattransport über GpHXT1p wahrscheinlich protonengekoppelt erfolgt. Allerdings zeigten nur <10 % der gemessenen Zellen eine entsprechende Reaktion des Membranpotentials. Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen, dass das injizierte cRNA-Produkt aus verschiedenen Gründen von den meisten Oozyten nicht korrekt exprimiert bzw. nicht funktionell in die Membran inseriert wurde. Möglicherweise war die hier injizierte cRNA nicht optimal für die Expression in Oozyten.

3.3.5 Aufnahme radioaktiv markierter Glukose in *Gphxt1*-transformierte Hefe

Die Aufnahmeexperimente wurden durchgeführt, um Informationen über Aufnahmekinetik, Substratspezifität, und Transportmechanismus und von GpHXT1p zu erhalten. Dazu wurden von den *Gphxt1*-transfizierten EBY VW4000-Klonen HMY13-S12, HMY13-S26, und HMY13-S617 Flüssigkulturen angelegt. Mit Aliquots welche jeweils die gleiche Menge an Hefezellen enthielten, wurden die Aufnahmezeiten für Glukose in die Hefe bestimmt. Dazu war ein Anteil der jeweils zugesetzten Glukosemenge radioaktiv markiert (^{14}C). Bei den Experimenten zur Aufnahmekinetik wurde untersucht, wie sich die Aufnahmezeiten für Glukose in die Hefen in Abhängigkeit von verschiedenen Glukosekonzentrationen änderten. Bei den Experimenten

zu Substratspezifität und Transportmechanismus wurde untersucht, ob und wie sich die Aufnahmeraten für eine jeweils konstante Glukosekonzentration in Gegenwart von Substratkompetitoren, ATPase-Hemmstoffen, und Entkopplern veränderte.

Zur Ermittlung der Aufnahmeraten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben aus einem Ansatz entnommen. Anhand der in der Probe gemessenen Radioaktivität wurde ermittelt, wie viel Glukose in die Hefe aufgenommen wurde. Die ermittelten Glukosemengen wurden jeweils gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Durch die erhaltenen Messpunkte wurde eine Ausgleichsgerade gelegt. Gemäß der Formel $V_A = dm/dt$ entspricht die Aufnahmerate der Steigung dieser Geraden. Die Messpunkte und die entsprechende Ausgleichsgerade einer exemplarischen Aufnahmemessung mit 75 mM Glukose im Inkubationsmedium sind in Abb. 59 gezeigt. Die Steigung (V_A) beträgt hier $0,017 \text{ nmol Glukose} \cdot 10^{-5} \text{ Zellen} \cdot \text{min}^{-1}$.

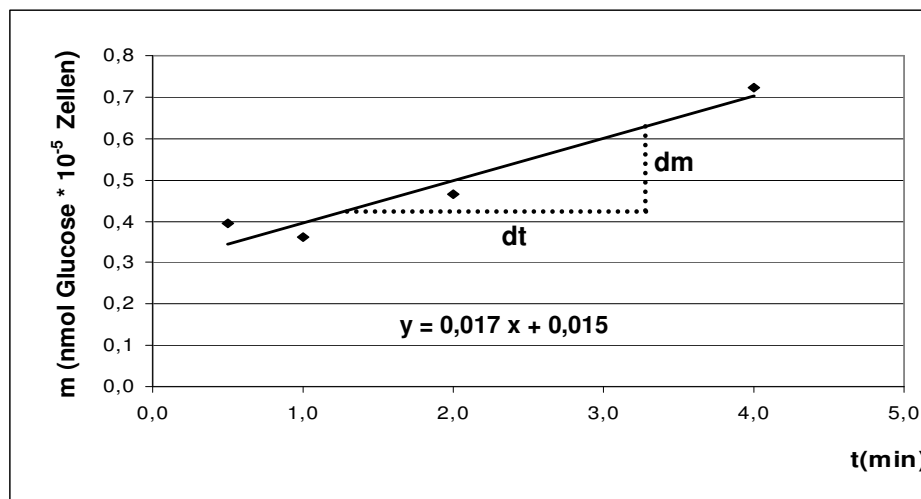


Abb. 59: Beispielergebnis zur Ermittlung der Glukoseaufnahmeraten in den GpHXT1p-exprimierenden EBY VW4000-Klon HMY13-S12. Gezeigt ist die Aufnahmerate bei einer Glukosekonzentration von 75 mM. Aufgetragen ist die von 10^5 Hefezellen aufgenommene Menge an Glukose gegen die Zeit. Gemäß der Formel $V = dm/dt$ entspricht die Steigung der Regressionsgeraden der Aufnahmerate und kann direkt aus der Geradengleichung abgelesen werden.

3.3.5.1 Untersuchung der Aufnahmekinetik von GpHXT1p

Mit diesem Experiment wurde die Kinetik der D-Glukoseaufnahme über GpHXT1p untersucht. Es wurde gemessen, wie sich die Aufnahmerate in Abhängigkeit der Konzentration ändert (Michaelis-Menten Kinetik). Die Aufnahmeraten (V) wurden in ein Diagramm gegen die entsprechende Konzentration (c) aufgetragen. Danach wurde eine Ausgleichskurve durch die Messpunkte gelegt, anhand derer konnten die Werte für die Michaelis-Menten-Konstante K_M (Substratkonzentration bei $V_{\max}/2$) und der maximalen Aufnahmerate V_{\max} graphisch ermittelt werden. Parallel dazu wurden die Werte für V und c nach Lineweaver-Burk transformiert und in einem weiteren Diagramm als $1/V$ gegen $1/c$

aufgetragen. Durch die Messpunkte wurde eine Ausgleichsgerade gelegt. Aus deren Gleichung konnten die Werte für K_M und V_{max} rechnerisch ermittelt werden

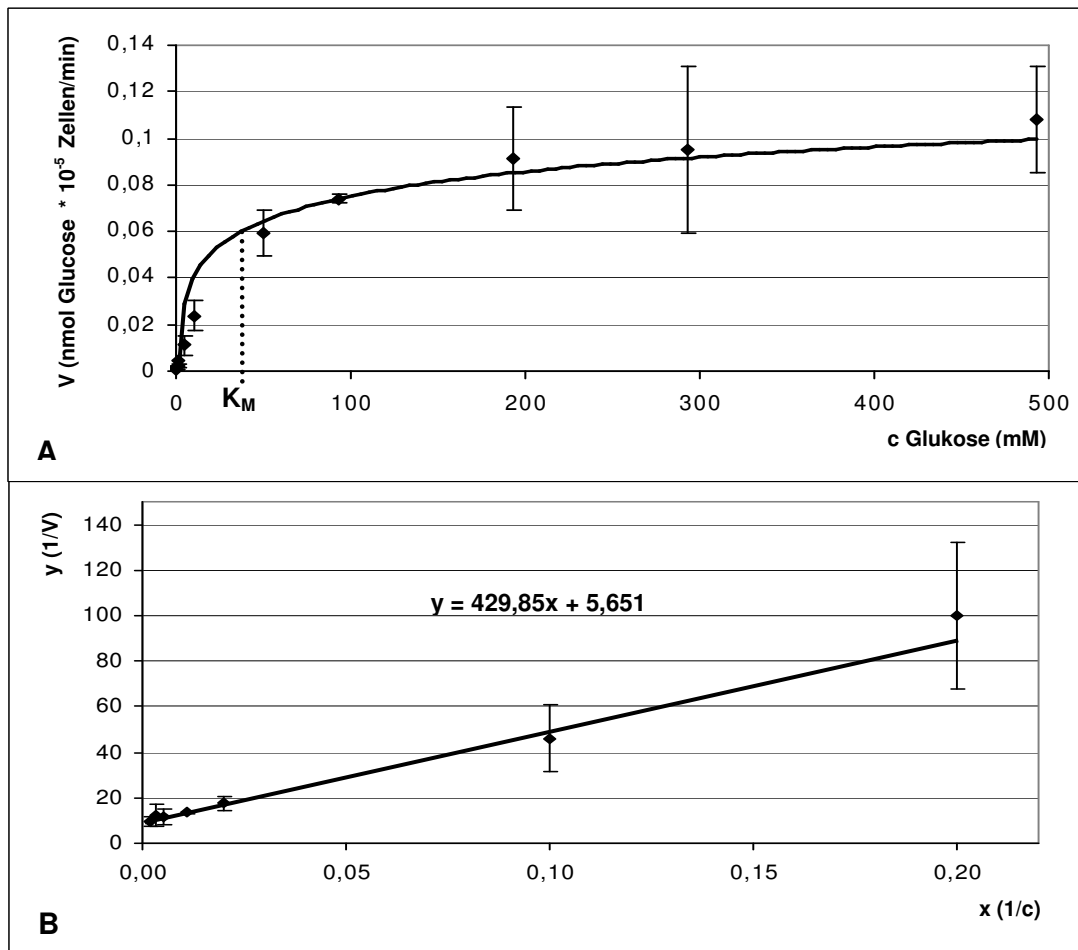


Abb. 60: Untersuchung der Aufnahmekinetik von GpHXT1p. Die Messungen wurden mit *Gphxt1*-transfizierten EBY VW4000-Klonen durchgeführt. **A:** Aus den Aufnahmeraten (V) für Glukose bei unterschiedlichen Konzentrationen (c) erstelltes Michaelis-Menten-Diagramm. Aufgetragen wurden die Aufnahmeraten ($n = 4$) gegen die entsprechenden Konzentrationen. **B:** Lineweaver-Burk-Diagramm aus der entsprechenden Transformation der Werte für V und c . Aufgetragen wurden die Werte $1/V$ gegen $1/c$. Aus beiden Diagrammen konnten graphisch bzw. rechnerisch die Werte für die maximale Transportgeschwindigkeit (V_{max}) sowie für die Michaelis-Menten-Konstante (K_M) ermittelt werden.

Anhand des Michaelis-Menten-Diagrammes (Abb. 60A) kann man erkennen, dass die Aufnahmerate für Glukose in Hefe über GpHXT1p zunächst konzentrationsabhängig ansteigt und dann ein Sättigungsverhalten aufweist. Der Wert für V_{max} kann auf etwa $0,12 \text{ nmol Glukose} \cdot 10^{-5} \text{ Zellen} \cdot \text{min}^{-1}$ geschätzt werden. Mit diesem Wert konnte anhand des Diagramms graphisch ein K_M von ca. 40 mM Glukose ermittelt werden.

Nach Lineweaver-Burk (Abb. 60B) ergibt sich eine Ausgleichsgerade mit der Gleichung $y = 430x + 5,65$. Daraus wurden die Werte für V_{max} und K_M rechnerisch ermittelt:

$$V_{max} = 1/b = 0,18 \text{ nmol Glukose} \cdot 10^{-5} \text{ Zellen} \cdot \text{min}^{-1}$$

$$K_M = a/b = 76 \text{ mM Glukose}$$

3.3.5.2 Weitere Untersuchungen zur Substratspezifität von GpHXT1p

In diesem Experiment wurde, wie bereits bei den Wachstumstests (siehe **3.3.1**), die Substratspezifität von GpHXT1p untersucht. Hier wurde nun gemessen, wie sich die Aufnahme für D-Glukose, bei einer konstanten Glukosekonzentration von 75 mM (mit einem Anteil ^{14}C -Glukose) in Gegenwart verschiedener D-Hexosen als Substratkompetitoren für GpHXT1p ändert. Durch diese Messungen wurde indirekt ermittelt ob und wie gut die getesteten Hexosen über GpHXT1p aufgenommen wurden. Die hier getesteten Hexosen waren bereits bei den erwähnten Wachstumstests als von HMY13-S12 metabolisierte und über GpHXT1p transportierte Substrate identifiziert worden. Bei diesen Wachstumstests war HMY13-S12 mit verschiedenen Hexosen unterschiedlich gut gewachsen. Bei einer hypothetischen Konzentration von jeweils 100-150 mM wachsen die Kulturen in folgenden Stärken: D-Mannose > D-Glukose > D-Fruktose >> D-Galaktose. Die hier durch Substratkompetition für jede der getesteten Hexosen ermittelte Transportstärke sollte anschließend mit dieser Reihenfolge verglichen werden.

Die Aufnahmeraten für Glukose wurden zunächst nur mit Glukose in 75 mM Konzentration (dies entspricht in etwa dem K_M von GpHXT1p) als Standard (100 %), danach mit jeweils zusätzlich einer der Hexosen im fünffachen Überschuss (375 mM) ermittelt. Würde eine der Hexosen gleich gut wie Glukose aufgenommen, so sollte die Aufnahmerate auf etwa 17 % ($=1/6$) vom Standardwert gehemmt werden. Bei einer besseren Aufnahme sollte die Rate weniger 17 %, bei einer schlechteren auf mehr als 17% betragen. Die Ergebnisse sind in Abb. 61 dargestellt.

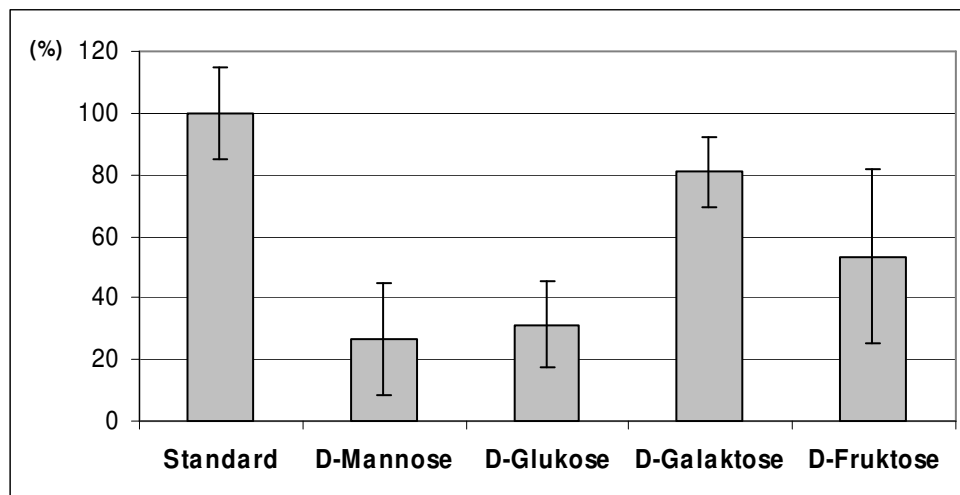


Abb. 61: Änderung der Aufnahmeraten bei 75 mM Glukose im Inkubationsmedium in Gegenwart von jeweils 375 mM verschiedener Substratkompetitoren für GpHXT1p. Die Aufnahmeraten wurden mit *Gphxt1*-transfizierten EBY VW4000-Klonen gemessen. Die Aufnahmerate bei 75 mM ohne Kompetitor wurde pro 10^5 Hefezellen gemessen und als Standard gleich 100 % gesetzt. Der Mittelwert der Aufnahmeraten ($n = 3$) in Gegenwart einer der Hexosen ist jeweils als prozentualer Anteil vom Standard aufgetragen.

Betrachtet man auf Abb. 61 zunächst das Ergebnis der Competition mit Glukose so wird die Aufnahmerate auf etwa bei 30 % vom Standard gehemmt, die erwarteten 17 % liegen aber noch innerhalb der Standardabweichung. Für Mannose liegt der Wert bei etwa 27 %. Im Vergleich zu den Wachstumstests sollte der Wert für Mannose weniger als 17 % betragen, auch dieser Wert liegt noch innerhalb der Standardabweichung. Für Galaktose beträgt der Wert etwa 80 % und für Fruktose etwa 52 %. Dies stimmt mit den Ergebnissen der Wachstumstests überein, danach sollten die Werte für diese beiden Substrate größer als 17% sein. Unter Berücksichtigung der hohen Standardabweichungen der einzelnen Messungen, könnte GpHXT1p die folgende Substratpräferenz aufweisen:

D-Mannose > D-Glukose >> D-Fruktose > D-Galaktose. Bei den Wachstumstests mit Flüssigkulturen (siehe 3.3.1.2) wurde für eine hypothetische Konzentration aller vier Substrate von 150 mM die gleiche Reihenfolge ermittelt. Bei diesen Tests lag nur Fruktose in 150 mM Konzentration vor, die anderen drei Substrate (höchste Konzentration: 50 mM) zeigten aber bereits ab ca. 25 mM eine Sättigung der Wachstumsrate. Diese Ergebnisse sind vergleichbar, da bei den hier durchgeführten Aufnahmeexperimenten die Kompetitoren in 375 mM Konzentration eingesetzt wurden.

3.3.5.3 Messungen zur Untersuchung des Transportmechanismus von GpHXT1p

In diesem Experiment wurde, wie bereits bei den pH-Messungen mit *Gphxt1*-transformierten Hefen (siehe 3.3.3) und den Potentialmessungen von mit *Gphxt1*-cRNA injizierten *Xenopus*-Oozyten (siehe 3.3.4), der Transportmechanismus von GpHXT1p untersucht. Hier wurde nun gemessen, ob und wie sich die Aufnahmerate für Glukose (mit einem Anteil ^{14}C -Glukose) bei jeweils konstanter Glukosekonzentration von 75 mM in Gegenwart verschiedener Hemmstoffe, welche indirekt die Funktion von GpHXT1p beeinträchtigen, ändert. Es wurden zwei Arten von Hemmstoffen verwendet:

- 1.) Entkoppler; diese zerstören einen an der Membran vorhandenen Protonengradienten. Verwendet wurden CCCP und DNP.
- 2.) ATPase-Hemmstoffe; diese verhindern den Aufbau eines Protonengradienten an der Plasmamembran. Verwendet wurden DES und Vanadat.

Wird die Aufnahmerate für die Glukose durch die Zugabe solcher Hemmstoffe reduziert, so ist der Transport über GpHXT1p wahrscheinlich protonengekoppelt.

Die Aufnahmeraten für Glukose wurden zunächst nur mit Glukose (75 mM) als Standard (100 %), danach mit jeweils einem Hemmstoff in 100 μM Endkonzentration gemessen. Die ermittelten Aufnahmeraten wurden im prozentualen Verhältnis zur Standardmessung mit 75 mM Glukose ohne Hemmstoffe in Form eines Balkendiagramms aufgetragen und sind in Abb. 62 dargestellt.

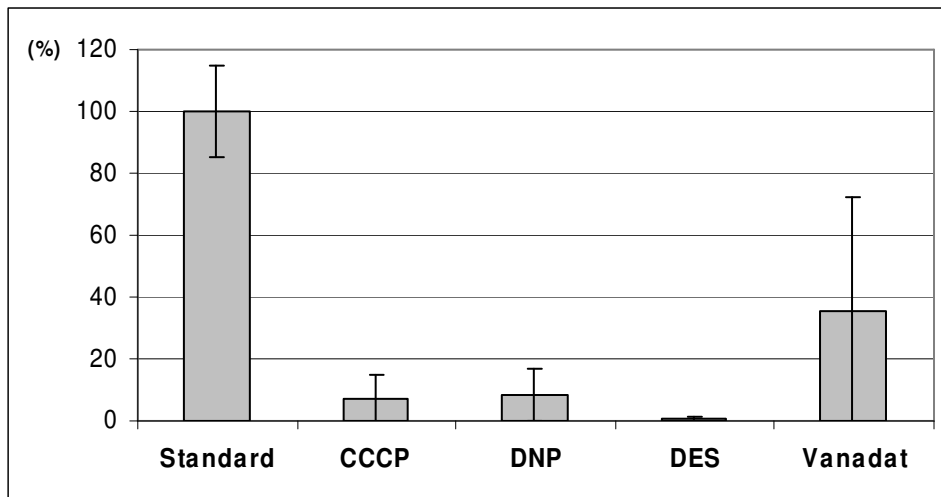


Abb. 62: Änderung der Aufnahmeraten bei 75 mM Glukose im Inkubationsmedium in Gegenwart von jeweils 100 μ M verschiedener Hemmstoffe für GpHXT1p. Die Aufnahmeraten wurden mit *hxt1*-transformierten EBY VW4000-Klonen gemessen, als Hemmstoffe wurden Entkoppler und ATPase-Hemmer verwendet. Die Aufnahmerate bei 75 mM ohne Hemmstoffe wurde pro 10^5 Hefezellen gemessen und als Standard gleich 100 % gesetzt. Der Mittelwert der Aufnahmeraten ($n = 3$) in Gegenwart des Hemmstoffs wurde jeweils als prozentualer Anteil vom Standard aufgetragen.

Abb. 62 zeigt, dass der Glukosetransport über GpHXT1p durch die Gegenwart der Hemmstoffe jeweils deutlich reduziert wurde. Die Gegenwart der Entkoppler CCCP und DNP reduzierte die Aufnahmeraten auf unter 20 % vom Standardwert. Der ATPase-Hemmer DES schien den Substrattransport über GpHXT1p fast völlig zu blockieren. Die Gegenwart von Vanadat, welches selektiv nur die so genannten Vanadat-sensitiven P-ATPasen hemmt, reduzierte die Aufnahmerate, unter Berücksichtigung der hohen Standardabweichung um etwa 2/3.

4. Diskussion

Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Pilzpartner der *Geosiphon-Nostoc*-Symbiose stellt einen Vertreter der *Glomeromycota* dar (Schüßler 2002). Dieses Pilzphylum umfasst die arbuskulären Mykorrhizapilze (AM-Pilze), welche mit über 80 % aller Landpflanzen die weit verbreitete und ökologisch wichtige AM-Symbiose ausbilden (Smith and Read, 1997). Aufgrund der taxonomischen Stellung des Pilzpartners sowie struktureller Ähnlichkeiten kann die *Geosiphon*-Symbiose als ein „Modell“ für die AM-Symbiose betrachtet werden. Eines der wesentlichen Merkmale der AM-Symbiose ist der Austausch von Nährstoffen zwischen den Symbionten. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Phosphat und Kohlenhydrate (Smith and Read, 1997). Das Phosphat wird dabei durch das extraradikale Pilzmyzel (ERM) aus dem Boden aufgenommen, in das intraradikale Myzel (IRM) transportiert und dort an den Pilz abgegeben. Im Gegenzug dazu werden bis zu 20 % der von der Pflanze photosynthetisch erzeugten Kohlenhydrate über die Wurzeln an den Pilz geliefert. Als Ort, an welchem der Austausch dieser Stoffe stattfindet, gilt allgemein der vom Pilz in der Pflanzenzelle gebildete Arbuskel (Smith et al., 2001). Die Mechanismen mit welchen die Nährstoffe ausgetauscht werden sind aber noch weitgehend unbekannt. Da zwischen den Symbionten keine symplastische Verbindung besteht, muss der Transport über die Plasmamembranen erfolgen. Dieser vermutlich aktive Transport benötigt Energie welche wahrscheinlich durch einen H^+ -Gradienten über die Zellmembranen bereitgestellt wird. Die daraus resultierende Ansäuerung des Bereiches um die Arbuskel konnte bereits gezeigt werden (Guttenberger 2000). Auf der pflanzlichen Seite konnten bisher aber nur Phosphattransporter, z.B. aus *Medicago* (Harrison et al., 2002), *Oryza* (Paszkowski et al., 2002) und *Solanum* (Rausch et al., 2001) identifiziert werden. Der auf der Pilz-Seite vermutete Zuckertransporter konnte aber noch aus keinem AM-Pilz isoliert werden. Die Aufklärung der molekularen Mechanismen des Nährstoffaustausches zwischen den Symbionten ist allerdings ein wesentlicher Schritt auf dem Weg zum Verständnis der Funktion der Symbiose. Ein Grund dafür, dass aus AM-Pilzen bislang nur wenige Gene identifiziert wurden (Harrier 2001; Requena und Breuninger 2004) besteht darin, dass die Mykorrhizapilze obligat symbiotisch sind und daher nicht axenisch kultiviert werden können. Da eine mykorrhizierte Wurzel überwiegend aus pflanzlichem Material besteht, enthält eine aus solchen Wurzeln hergestellte cDNA-Bank nur wenig pilzliche cDNA (Delp et al., 2000). Die hier untersuchte „AM-Modellsymbiose“ *Geosiphon* bietet den wichtigen Vorteil, dass nur der Pilzpartner eukaryotisch ist. Die pilzliche (polyA) mRNA kann leicht von der bakteriellen mRNA abgetrennt und zu cDNA umgeschrieben werden. In dieser Arbeit wurde eine subtraktive- und eine Vollängen-cDNA-Bank von *Geosiphon pyriformis* angelegt. Aus der Vollängen-cDNA-Bank konnte, mittels funktioneller Hefekomplementation, der erste Zuckertransporter aus einem Vertreter der *Glomeromycota* isoliert werden.

4.1 Herstellung und differentielles Screening einer subtraktiven cDNA Bank aus *Geosiphon pyriformis*

Es sollte versucht werden, aus *Geosiphon pyriformis* symbiosespezifisch exprimierte Gene, wie z.B. Zuckertransporter zu isolieren. Dazu wurde mittels subtraktiver Hybridisierung (nach Diatchenko et al., 1996) zweier cDNA-Proben von *Geosiphon* eine „subtraktive“ cDNA-Bank hergestellt. Die zur Herstellung der cDNA-Proben verwendeten *Geosiphon*-Blasen waren 72 h im Licht bzw. im Dunkeln inkubiert worden. Anschließend wurde die Bank mittels differentiellem Screening nach cDNAs, durchsucht deren korrespondierendes Gen im Licht stärker als im Dunkeln exprimiert wird. Es wurde vermutet, dass im Licht auch die Expression von Genen für den Zuckertransport erhöht ist. Die Inkubationsdauer von 72 h wurde gewählt, weil angenommen wurde, dass eine Verlängerung der natürlichen Licht- bzw. Dunkelphase zu einer stärkeren Umstellung des Kohlenstoff-Metabolismus als im normalen Tag / Nachtrhythmus führen würde. Somit würden in der Blase Verhältnisse hergestellt, wie sie vermutlich auch im unterirdisch wachsenden Myzel anzutreffen sein dürften. Nehls et al. (1998) konnten z. B. bei dem Ektomykorrhizapilz *Amanita muscaria* zeigen, dass sich durch eine Erhöhung der Glukosekonzentration im Inkubationsmedium innerhalb von ein bis vier Tagen eine Erhöhung der Expression des Zuckertransporters *AmSt-1* induzieren lässt.

polyA-RNA-Isolation aus *Geosiphon* und cDNA-Synthese

Die in den *Geosiphon*-Blasen enthaltene polyA-RNA-Menge wurde zunächst durch Schätzung und danach durch Messung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ribo Green ermittelt. Beide Methoden ergaben die relativ gut übereinstimmenden Werte von ca. 0,16 bzw. 0,2 ng polyA-RNA pro Blase. Die anschließend aus der polyA-RNA synthetisierte cDNA wurde vor der Verwendung für die subtraktive Hybridisierung mittels Agarosegeleanalyse, Klonierung in *E. coli* und Sequenzierung auf ihre Qualität überprüft. Zunächst sollte untersucht werden, ob die Trennung von pilzlicher und bakterieller RNA mit der angewandten Methodik funktionierte. Weiter war von Interesse, ob das Umschreiben der in dieser Arbeit zur Verfügung stehenden, geringen polyA-RNA-Mengen mit dem „SMART-System“ intakte cDNA lieferte. Die nach der Synthese erhaltene cDNA mit einer Größenverteilung von ca. 250 bis 2000 bp stimmt in etwa mit den Literaturwerten für eukaryotische cDNA überein. So geben z.B. Couvreur et al. (2003) die Größenverteilung von PCR-amplifizierter cDNA aus *Leishmania infantum*, je nach PCR-Bedingungen mit ca. 500-2000 bp bzw. mit 500-4000 bp an. Piao et al. (2001) konnten durch PCR-Amplifikation von cDNA aus *Mus musculus* eine, ebenfalls mit den Bedingungen der PCR variierende Größenverteilung von ca. 500-2000 bp bzw. 1300-6500 bp erreichen. Zur weiteren Untersuchung der cDNA wurde diese kloniert und die Plasmidinserts von insgesamt 56 zufällig ausgewählten Klonen sequenziert. Die zunächst ermittelte Durchschnittsgröße lag mit 950 bp im Rahmen verschiedener Literaturwerte. So geben z.B. Ko et al. (2000) 1500 bp als durchschnittliche Insertgröße

klonierter, PCR-amplifizierter cDNA aus *Mus musculus* an. Bei der Auswertung der Sequenzen wurden zunächst darauf geachtet, ob an den 3'-Enden ein polyA zu finden war. Dieses konnte bei allen Sequenzen identifiziert werden. In einem Bereich zwischen 20 bis 50 Nukleotiden stromaufwärts vom polyA findet man bei eukaryotischer cDNA zumeist das Polyadenylierungssignal (meist ATTAAA oder AATAAA; Tran et al., 2001). Dieses konnte bei ca. 90 % der hier untersuchten Sequenzen gefunden werden. Bei Sequenzen, die kein Polyadenylierungssignal enthalten, muss davon ausgegangen werden, dass bei der RNA-Isolation das polyT der Dynabeads nicht an das polyA sondern an eine sequenzinterne, A-reiche Region gebunden hat. Bei der weiteren Untersuchung wurde in den cDNA-Sequenzen der insgesamt 46 durchsequenzierten Plasmidinserts nach offenen Leserastern (ORFs) und Startcodons gesucht. Bei 74 % der Sequenzen konnte ein ORF von mehr als 50 AS Länge identifiziert werden. Bei den übrigen Sequenzen konnten statt durchgehender ORFs nur eine Vielzahl kleinerer ORFs von nicht mehr als ca. 20 AS Länge oder ein längerer ORF ohne Startcodon am Beginn entdeckt werden. Viele kleine ORFs in einer cDNA-Sequenz lassen vermuten, dass diese von einer noch nicht fertig prozessierten mRNA abstammt. Der eigentliche ORF ist somit noch durch mehrere Introns unterbrochen. Beginnt ein ORF jedoch ohne Startcodon direkt am 5'-Ende der cDNA, so stammt diese vermutlich von einer am 5'-Ende teilweise degradierten mRNA ab. Diese Degradation kann sich sowohl *in vitro* während der Präparation als auch bereits *in vivo* ereignet haben. Die Translation eukaryotischer mRNA beginnt in der Regel mit dem Startcodon AUG. Dies trifft jedoch nicht immer zu. In einigen Fällen kann die Initiation der Translation auch an so genannten „alternativen“ Startcodons erfolgen. Die hier untersuchten cDNA-Sequenzen enthielten zu einem gewissen Prozentsatz ebenfalls „alternative“ Startcodons. Dies waren vor allem TTG (12 %) und CTG (3 %). Dass die Translation eukaryotischer Proteine *in vivo* auch von den hier gefundenen „alternativen“ Startcodons eingeleitet werden kann, ist in der Literatur bereits beschrieben worden (Touriol et al., 2003; Nett et al., 2001; Peabody et al., 1989). In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob die Länge der ORFs mit der Länge der zugehörigen cDNA-Sequenzen in einem sinnvollen Zusammenhang steht. Es ist bekannt, dass die Längen der 5'-und 3'-untranslatierten Regionen (UTRs) eukaryotischer mRNAs zum Teil erhebliche Schwankungen aufweisen. So reicht die Länge der 5'-UTR bei Pilzgenen von 16 bis 1088 bp (Ø 134 bp), bei der 3'-UTR von 25 bis 1141 bp (Ø 237bp) (Mignone et al., 2002). Für eine so genannte „Modell-mRNA“ von Hefe geben Hurowitz und Brown (2003) eine durchschnittliche UTR-Länge von 276 bp an. Somit passen die für *Geosiphon*-cDNA-Sequenzen ermittelten Durchschnittslängen der 5'-UTRs (114 bp) und der 3'-UTRs (282 bp) relativ gut zu den Literaturwerten. Allerdings wurde bei einigen Sequenzen, die zumeist für ribosomale Untereinheiten kodieren, nur eine relativ kurze 5'-UTR mit einer Länge zwischen 3 und 30 bp (siehe Anhang) identifiziert. Die ORFs dieser Sequenzen waren dabei nicht trunkiert. Dies

kann zumindest aufgrund der durch BLASTP (NCBI conserved domain search) identifizierten, konservierten Bereiche vermutet werden. Eine kurze 5'-UTR scheint jedoch generell eine Eigenschaft der Gene für Proteine ribosomaler Untereinheiten zu sein (Mignone et al., 2002). Hughes und Andrews, (1997) konnten zudem zeigen, dass bei eukaryotischer mRNA *in vitro* eine Länge von 1 bp bei der 5'-UTR ausreicht um die Translation einzuleiten.

Bei der Analyse der 10 teilsequenzierten Plasmidinserts ergab sich ein ähnliches Bild wie bei den durchsequenzierten Plasmidinserts. Abschließend wurden alle cDNA-Sequenzen einer BLAST-Analyse unterzogen. Nach der Annotation zeigte sich, dass der größte Teil der Sequenzen Ähnlichkeiten zu bereits identifizierten Genen bzw. deren Produkten aufweist. Der Anteil von Ähnlichkeiten zu Genen mit noch unbekannter Funktion liegt mit 20 % niedriger oder etwa gleich hoch wie in vergleichbaren Publikationen berichtet. So ergab ein von Wipf et al. (2003) durchgeführtes EST-Projekt mit ca. 500 Sequenzen von *Hebeloma cylindrosporum* bei ca. der 60 % der Sequenzen Ähnlichkeiten zu Genen unbekannter Funktion. Ouziad et al. (2005) erhielten bei der Annotation von 432 Sequenzen aus *Lycopersicon esculentum* einen Anteil von 17 % an Ähnlichkeiten zu Genen unbekannter Funktion. Allerdings stammen diese Sequenzen aus einer subtrahierten cDNA-Bank. Somit ist nicht sicher, ob sich dieser Wert ohne weiteres mit den hier erzielten Resultaten vergleichen lässt. Ein weiteres, wesentliches Ergebnis der BLAST-Analyse war, dass keine der Sequenzen Homologien zu *Nostoc*-Genen aufwies, obwohl das Genom des nah verwandten *Nostoc punctiforme* Stammes ATCC29133 (Meeks et al., 2001) durchsequenziert ist. Die Abtrennung der pilzlichen von der bakteriellen mRNA mittels der hier etablierten Methode scheint somit gut zu funktionieren. Durch die Sequenzanalyse der cDNA konnte gezeigt werden, dass sich mit der hier angewendeten Methodik auch aus geringen Mengen an *Geosiphon*-polyA-RNA cDNA guter Qualität herstellen lässt.

Subtraktive Hybridisierung

Mit cDNA aus den im Licht bzw. im Dunkel inkubierten *Geosiphon*-Blasen wurde eine subtraktive Hybridisierung durchgeführt. Die im Verlauf der Versuche durchgeführten Kontrollexperimente zur Effizienz von Adaptorligation und Subtraktion ergaben jeweils die Resultate wie sie anhand der Angaben in den Herstellerprotokollen der verwendeten Kits zu erwarten waren.

Differentielles Screening

Mit der erhaltenen „subtrahierten“ cDNA wurde eine „subtraktive“ Bank mit 282 *E. coli*-Klonen angelegt. Diese wurde anschließend mittels differentielltem Screening nach Genen durchsucht, deren Expression in *Geosiphon* im Licht bzw. Dunkel differentiell reguliert wird. Als Sonde wurde markierte cDNA aus der Vorwärtssubtraktion verwendet. Dabei wurden

insgesamt 43 cDNAs identifiziert, deren korrespondierendes Gen im Licht möglicherweise verstärkt exprimiert ist. Die Sequenzierung der 43 cDNAs ergab jedoch, dass insgesamt nur fünf Sequenzen verschieden waren. Alle anderen Sequenzen waren als solche mit einer dieser fünf Sequenzen identisch, teilweise aber deutlich verkürzt. Eine anschließend durchgeführte BLAST-Analyse ergab bei vier der Sequenzen (*hm24-E11*, *hm24-H4*, *hm26-H3* und *hm27-F2*) schwache Ähnlichkeiten zu gewissen Transportproteinen bzw. Komponenten von Transportsystemen. Die Sequenz *hm26-H3* wies dabei Ähnlichkeit zu einem Glukosetransporter eines Basidiomyceten auf. Die differentielle Expression dieser Gene konnte durch ein weiteres, unabhängiges RT-PCR-Experiment mit verschiedenen lange im Licht bzw. im Dunkel inkubierten *Geosiphon*-Blasen jedoch nicht bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung für diese, zumindest in Bezug auf die differentielle Expression der Gene, „falschpositiven“ Resultate ist die verschiedene Länge der cDNA-Sequenzen. Für die Funktion der subtraktiven Hybridisierung ist wesentlich, dass cDNAs, die in beiden Proben vorkommen, die gleiche Länge besitzen. Ist dies nicht der Fall, so funktioniert die „Ausfilterung“ solcher nichtdifferentiell exprimierter Transkripte durch Bildung von ds-cDNA-Hybriden aus Tester- und Treiber-cDNA nicht oder nur wesentlich schlechter (siehe **2.11.17**). Allerdings waren die Längenunterschiede der Sequenzen teilweise unwesentlich, so dass diese Erklärung nicht in allen Fällen zutreffen kann. Möglicherweise ist auch das Ergebnis des RT-PCR-Experiments nur mit Vorsicht zu betrachten, da bereits nur wenige PCR-Zyklen zuviel die durch differentielle Genexpression entstandenen Template-Konzentrationsunterschiede egalalisieren. Dass gleiche cDNA-Sequenzen mehrfach ein positives Signal auf den Blots des differentiellen Screenings ergaben, spricht dafür, dass das entsprechende Gen möglicherweise doch differentiell exprimiert ist. Als nächster Schritt wäre nun in Betracht gekommen, die erhaltenen Sequenzen näher zu untersuchen. Die gescreente „subtraktive“ cDNA-Bank wurde jedoch aus Restriktionsfragmenten aufgebaut. Die entsprechenden Vollängen der daraus erhaltenen cDNA-Sequenzen über RACE-PCR oder ähnliche Methoden zu isolieren wurde aufgrund der nur schwachen Ähnlichkeit zu den erwähnten Transportproteinen und aus Zeitgründen zurückgestellt.

4.2 Aufbau einer Hefeexpressions-cDNA-Bank, Isolation und Sequenzanalyse des Zuckertransportergens *Gphxt1* aus *Geosiphon pyriformis*

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde eine Hefeexpressions-cDNA-Bank aus *Geosiphon pyriformis* hergestellt. Durch funktionelle Komplementation der Hefemutante EBY VW4000 mit Plasmiden aus dieser Bank konnte die cDNA-Sequenz des Zuckertransporters *Gphxt1* aus *Geosiphon pyriformis* isoliert werden.

Aufbau einer Hefeexpressions-cDNA-Bank von *Geosiphon pyriformis*

Für die funktionelle Komplementation von EBY VW4000 wurde eine cDNA-Bank aus *Geosiphon pyriformis* hergestellt. Zur Herstellung von cDNA wurde auf die Methode der polyA-RNA-Isolation mit Dynabeads und anschließender cDNA-Synthese mit einer Variante des „SMART-Systems“ zurückgegriffen. Letztere ermöglichte ein gerichtetes Klonieren der cDNA in den verwendeten Hefeexpressionsvektor. Die nach der Synthese erhaltene cDNA (ca. 500-8000 bp) zeigte im Vergleich zur cDNA welche bei der subtraktiven Hybridisierung verwendet wurde (ca. 250-2000 bp) eine bessere Größenverteilung, da sie einen Anteil wesentlich längerer cDNA-Fragmente enthielt (siehe Vergleich mit eukaryotischer cDNA unter 4.1). Dies ist auf die im Laufe der Arbeit verbesserte Methodik zurückzuführen. Nach Klonierung der cDNA und Transformation in *E. coli* wurden ca. $6 \cdot 10^5$ Klone erhalten. Es wird angenommen, dass *Saccharomyces cerevisiae* ca. 6200 verschiedene Gene enthält (Ball et al., 2000). Nimmt man an, dass *Geosiphon* eine ähnliche Anzahl von Genen enthält und dass von einem Gen möglicherweise verschiedene mRNA-Transkripte in einer Zelle vorliegen, so sollte eine *Geosiphon*-cDNA Bank mit $6 \cdot 10^5$ Klonen theoretisch von allen präsenten mRNAs eine cDNA-Kopie enthalten. Durch PCR-Amplifikation und Sequenzierung 20 verschiedener, zufällig ausgewählter Klone wurde die Qualität der cDNA-Bank untersucht. Die ermittelte Rekombinanz von 95 % bei einer durchschnittlichen Insertgröße von 1100 bp ist vergleichbar mit den Resultaten anderer Arbeitsgruppen. Zum Beispiel erhielten Wipf et al. (2003) bei der Untersuchung einer cDNA-Bank aus *Hebeloma cylindrosporum* eine Rekombinanz von 97 % und eine durchschnittliche Insertgröße von ebenfalls 1100 bp. Aus der Sekundär-Bank wurden Plasmide präpariert und damit die funktionelle Hefekomplementation durchgeführt. Zunächst wurden jedoch die Bedingungen für das Screening der Hefe nach der Transformation ermittelt. Bei der verwendeten Hefemutante EBY VW 4000 sind alle 20 für den Hexosetransport in Hefe benötigten Gene sowie das Gen für die Uracilsynthese (*ura3*) ausgeschaltet (Wieczorke et al., 1999). Um falschpositive Resultate zu vermeiden, wurde zunächst überprüft, ob die untransformierte Mutante auf Medien mit verschiedenen Konzentrationen an D-Glukose als einziger Kohlenstoffquelle wachsen kann. Eine Aufnahme von Glukose in Hefe durch einfache Diffusion über die Zellmembran wurde postuliert (Fuhrmann und Völker, 1993; 1993; Walsh et al., 1994). Hingegen konnten Reifenberger et al. (1997) durch Aufnahmeexperimente mit einer Hexoseaufnahme-Defektmutante zeigen, dass eine solche passive Diffusion selbst bei Glukosekonzentrationen von bis zu 100 mM im Außenmedium nicht erfolgt. Die hier erzielten Resultate bestätigen dieses Ergebnis, da bis zu einer Glukosekonzentration von 177,6 mM kein Wachstum der Mutante EBY VW4000 beobachtet wurde.

Isolation und Analyse des Zuckertransportergens *Gphxt1* aus *Geosiphon pyriformis*

Zunächst wurde die Hefemutante EBY VW 4000 mit der Plasmid-cDNA-Bank aus *Geosiphon pyriformis* transformiert. Bei allen durchgeführten Negativkontrollen konnte kein Wachstum beobachtet werden. Die Mutante EBY VW4000 scheint daher keine falschpositiven Ergebnisse in Form eines so genannten „Hintergrundwachstums“ zu liefern wie dies zu Beginn der Arbeit vermutet wurde. Nach dreimaliger Selektion der Transformanten (zunächst auf Medium ohne Uracil, danach zweimalig auf Medium ohne Uracil und mit 22 mM Glukose als einziger Kohlenstoffquelle) konnte aus den gewachsenen Klonen ein 1845 bp langes cDNA-Insert sequenziert werden. Die BLASTX-Analyse ergab über eine Sequenzlänge von ca. 1400 bp Ähnlichkeiten von bis zu 40 % zu Sequenzen von bereits bekannten Zuckertransportern. Somit war es gelungen, aus *Geosiphon pyriformis* die cDNA eines Zuckertransporters zu isolieren der in dieser Arbeit allgemein mit *Gphxt1* bzw. GpHXT1p (für das Protein) bezeichnet wird. Die im Folgenden diskutierten Untersuchungen sollten Informationen über die Struktur von GpHXT1p liefern. Aus der 1845 bp langen cDNA-Sequenz konnten die Aminosäuresequenzen von drei offenen Leserahmen (ORF) mit den Längen 432 (ORF1), 480 (ORF2) und 496 AS (ORF3) abgeleitet werden. Die cDNA-Sequenz von ORF1 beginnt mit ATG, die von ORF2 mit dem alternativen Startcodon TTG und die von ORF3 ohne Startcodon direkt mit dem 5'-Ende der cDNA. Alle drei ORFs enden jedoch am gleichen Stopcodon. Bei der BLASTP-Analyse (NCBI) der AS-Sequenzen dieser drei ORFs konnte ein konservierter Bereich von 461 AS Länge identifiziert werden. Dieser konservierte Bereich ist charakteristisch bei Zuckertransportern die zur „major facilitator superfamily“ (MFS) gehören. Die Mitglieder dieser Familie katalysieren den Transport kleinerer Moleküle über Zellmembranen und besitzen meist 12 hydrophobe Sequenzabschnitte von jeweils ca. 20 AS Länge (Pao et al., 1998). Diese hydrophoben Sequenzabschnitte sind in der Zellmembran lokalisiert, durch hydrophile Sequenzabschnitte von variabler Länge miteinander verbunden und werden als Transmembran-Helices (TMH) bezeichnet. In allen drei ORFs konnten 11 (ORF1 und 2) bzw. 12 solcher TMH (ORF3) identifiziert werden. Die AS-Sequenzen von Zuckertransportern die zur MFS-Familie gehören, enthalten noch weitere konservierte Sequenzen (Watari et al., 2004). Auch diese wurden bei GpHXT1p identifiziert. Es handelt sich dabei um die Sequenzen VETPRYL (Konsensus: PESPRXL), RQGRK (Konsensus: R/KXGRR/K) und PETKGRTLEE (Konsensus: PETQGRXXE). Nach Bush (1993) sind solche Sequenzen bei den verschiedenen Zuckertransportern zu 65-97% (pro AS) konserviert. Anhand dieser Ergebnisse kann GpHXT1p eindeutig zu den MFS gezählt werden.

Es stellt sich nun aber die Frage, welcher der drei ORF das *in vivo* exprimierte Protein repräsentiert und ob die cDNA-Sequenz eventuell von einer trunkierten mRNA abstammt. Im

Folgenden soll diskutiert werden, was jeweils für oder gegen eine der drei Möglichkeiten spricht:

1.) ORF1

Die cDNA-Sequenz dieses ORFs beginnt mit dem regulären Startcodon ATG. Der N-Terminus (3 AS) dieses Proteins wäre mit 3 AS allerdings sehr kurz. Die Länge der N- und C-Termini der meisten Hexosetransporter liegt etwa bei 50 AS (Johnston 1999). Somit wäre es möglich, dass die „in frame“-Position dieses ATG-Startcodons rein zufällig ist. Die Sequenzen, welche ein eukaryotisches Startcodon flankieren, sind aber konserviert und entsprechen mehr oder weniger genau der so genannten „Kozak-Sequenz“ ACCATGG (Kozak 1986). Die Umgebung des Startcodons von ORF1 besitzt die Sequenz ACCAATGG und enthält somit ein A mehr als die „optimale“ Kozak-Sequenz. Wird ein ATG von einer optimalen Kozak-Sequenz flankiert, so ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich stromaufwärts ein weiteres Startcodon befindet, nur gering. (Kozak 1986). Möglicherweise macht die Verschiebung der „Kozak-Sequenz“ des ATGs von ORF1 um ein „A“ dieses zu einem so genannten „schwachen“ Startcodon. Dies würde darauf hindeuten, dass sich stromaufwärts noch ein weiteres Startcodon befindet (Kozak, 1986; Mignone et al., 2002).

2.) ORF2

Die cDNA-Sequenz dieses ORFs beginnt mit dem alternativen Startcodon TTG, allerdings wird dieses Startcodon nicht von einer Kozak-Sequenz flankiert so dass nicht gesagt werden kann, ob dieses TTG als Startcodon genutzt wird. Das generelle Vorkommen von TTG als alternativem Startcodon, und dessen Identifikation in verschiedenen cDNA-Sequenzen aus *Geosiphon* wurde bereits unter **4.1** diskutiert. Zudem ist die aus ORF2 abgeleitete AS-Sequenz bis zu diesem TTG konserviert. (siehe AS-Alignment unter **3.2.2.5**). Es kann also angenommen werden, dass ab dem Startcodon TTG auch translatiert werden kann.

3.) ORF3

Die cDNA-Sequenz dieses ORF besitzt kein Startcodon. In der daraus abgeleiteten AS-Sequenz konnten aber die MFS-typischen 12 TMH identifiziert werden. In den beiden kürzeren ORFs 1 und 2 wurden dagegen nur 11 TMH vorhergesagt. Daraus ergeben sich zwei mögliche Erklärungen: Erstens wäre es möglich, dass der verlängerte N-Terminus von ORF3 nur zufällig einen weiteren hydrophoben Bereich enthält. Zweitens aber besteht die Möglichkeit, dass die hier isolierte cDNA von *Gphxt1* von einer am 5'-Ende teilweise degradierten mRNA abstammt. Die Vollängen-cDNA von *Gphxt1* würde somit für ein Protein mit 12 TMH kodieren.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die hier isolierte, 1845 bp lange cDNA-Sequenz von *Gphxt1* möglicherweise von einer degradierten mRNA abstammt, aber die Sequenz für ein funktionelles Protein mit wahrscheinlich 11 TMHs enthält. Letzteres ergibt sich daraus, dass der EBY VW4000-Klon aus dem *Gphxt1* isoliert wurde, funktionell

komplementiert war. Von einer putativen Vollängen-mRNA von *Gphxt1* könnten daher möglicherweise auch zwei oder drei verschiedene Proteine translatiert werden. Es ist bekannt, dass die 5'-Regionen eukaryotischer mRNAs in 15-50% der Fälle (abhängig vom Organismus) mehrere Startcodons besitzen (Mignone et al., 2002). Die so genannte „erstes ATG“-Regel wird bei der mRNA-Translation teilweise ignoriert. Die ribosomale 40S-Untereinheit umgeht dabei in einigen Fällen, abhängig davon, wie gut die Umgebung des ATG mit der Kozak-Sequenz übereinstimmt, das erste Startcodon. In diesem Falle wird die Translation von einem weiteren Startcodon stromabwärts eingeleitet („leaky-scanning“-Mechanismus). Somit können durch unterschiedliche Translation einer mRNA verschiedene Proteine erhalten werden (Xiong et al., 2001). Es ist daher möglich, dass GpHXT1p in einer Variante mit 12 TMH und in einer weiteren Variante mit 11 TMH exprimiert wird. Funktionelle Zuckertransporter mit 11 TMH wurden bereits beschrieben. Ein Beispiel dafür ist der Zuckertransporter HXT5 aus *Saccharomyces cerevisiae* (Kruckeberg et al., 1996). Dieses Protein besitzt aber einen N-Terminus mit einer Länge von ca. 200 Aminosäuren in welcher sich keine weitere TMH befindet. Bei der cDNA von *Gphxt1* ist dies nicht der Fall: Eine Untersuchung des ORF 3 ergibt klar 12 TMH. Möglicherweise befindet sich in der AS-Sequenz von ORF1 und ORF2 die fehlende zwölfte Transmembran-Sequenz auch innerhalb der ca. 90 AS langen hydrophilen Schleife zwischen den Helices fünf und sechs. Es ist bekannt, dass auch AS-Sequenzen mit geringer Hydrophobizität Membranen durchspannen können, wenn sie sich in unmittelbarer Nachbarschaft von Sequenzen mit hoher Hydrophobizität befinden (Lodish 1988). Die beschriebene hydrophile Schleife ist charakteristisch für die Mitglieder der MFS-Familie und bewerkstelligt möglicherweise sogar den Substrattransport (Tanner und Caspari, 1996). Eine weitere TMH in diesem Bereich würde im Fall von GpHXT1p diese Schleife auf ca. 70 AS verkürzen, die typische Länge liegt bei 52 AS (Goswitz und Brooker, 1995).

Über den Zweck, den eine „multiple“ Proteinexpression im Falle von GpHXT1p erfüllen könnte, kann beim momentanen Stand der Arbeit nur spekuliert werden. Denkbar wäre, dass eine Variante, z.B. die mit 12 TMHs ein reines Transportprotein ist. Die Variante mit 11 TMHs könnte zusätzlich sensorische Funktionen besitzen. Die in *Saccharomyces cerevisiae* identifizierten Proteine SNF3 und RGT2 sind homolog zu anderen Hefe-Hexosetransportern, messen aber die extrazelluläre Glukosekonzentration. Intrazellulär wird dann ein Signal weitergeleitet welches, je nach Bedarf, die Expression von „high-“ oder „low-affinity“-Transportern auslöst (Lalonde et al., 1999). Obwohl homolog zu funktionellen Transportern, transportieren diese beiden Proteine kein oder nur sehr wenig Substrat. Der geringe Substrattransport dient dabei vermutlich nur einer Konformationsänderung des Proteins wodurch intrazellulär das Signal weitergeleitet wird. Eine Zelle, welche zur Versorgung mit Zuckern nur auf ein solches Protein angewiesen ist, wäre vermutlich nicht lebensfähig. Die

hier untersuchte cDNA wurde aber in der Hefemutante EBY VW4000 funktionell exprimiert. Dieses funktionelle Protein kann nur die Variante mit 11 TMH gewesen sein, es sei denn, dass die Hefe möglicherweise in der Lage ist, trotz fehlendem Startcodon ein Protein in der Art der AS-Sequenz von ORF3 mit 12 TMH funktionell zu exprimieren. Möglicherweise wird dabei der 51 AS lange N-Terminus der AS-Sequenz von ORF2 als zwölfte TMH in die Membran inseriert. Es gibt im Moment jedoch keine Anhaltspunkte anhand derer diese Überlegungen bewiesen werden könnten. Wollte man also weiter einer GpHXT1p-Variante sensorische Aufgaben zuschreiben, so müsste ein solches Protein zusätzlich auch Substrat transportieren. Ein solcher Transporter mit „Doppelfunktion“ wurde bereits für *Arabidopsis thaliana* postuliert (Rolland 2001). Charakteristisch für solche Zuckersensoren ist ein relativ langer, intrazellulärer C-Terminus von ca. 100-300 AS Länge (Lalonde et al., 1999; Madi et al., 1997) welcher der Signaltransduktion dient. Der C-Terminus von GpHXT1p mit nur 26 AS Länge wäre somit aber untypisch für ein solches Protein. Eine weitere Möglichkeit welchen Zweck ein Transporter mit 11 bzw. 12 TMH haben könnte, wäre, dass ein Protein eine niedere („low-affinity“) und das andere eine hohe („high-affinity“) Affinität zum transportierten Substrat haben könnte. Dieser Unterschied könnte durch die beim Protein mit 11 TMH fehlende zwölfte Helix verursacht werden. Für den Hexosetransporter HXT2 aus *Saccharomyces cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass spezifische Bereiche in den TMH 1, 5, 7 und 8 essentiell für dessen Funktion als „high-affinity-Transporter sind (Kasahara und Kasahara 2003). Beim momentanen Stand der Arbeit kann also noch nichts Abschließendes über die Proteinstruktur von GpHXT1p gesagt werden. Um weitere Aussagen treffen zu können muss zunächst die komplette genomische Sequenz von *Gphxt1* identifiziert werden. Diese Arbeiten werden im Moment im Rahmen einer weiteren Dissertation (Nachfolgeprojekt dieser Arbeit) durchgeführt. Wenn alle weiteren Startcodons stromaufwärts von der gegenwärtig bekannten Sequenz identifiziert sind, können über Proteinstruktur und mögliche Varianten bei der Proteinexpression von GpHXT1p weitere Analysen durchgeführt werden. Abschließend sollte noch die Frage geklärt werden, warum bei der BLAST-Analyse von *Gphxt1* bzw. GpHXT1p die besten „Hits“ zu Genen von Vertebraten und nicht wie erwartet zu Pilzen erhalten wurden. Dazu wurde die Aminosäuresequenz des ORF 3 mittels BLASTP und psiBLAST untersucht. Mit den AS-Sequenzen der 130 besten „Hits“ und der AS-Sequenz von ORF3 wurde ein Alignment und aus diesem phylogenetische Stammbäume erstellt. Anschließend wurden mit einer maximum-likelihood-Methode die Verwandtschaftsbeziehungen der Sequenzen zueinander ermittelt. Mit dem Ergebnis dieser Analyse konnte gezeigt werden, dass GpHXT1p am nächsten mit Zuckertransportern verschiedener Ascomyceten verwandt ist. Somit konnte eindeutig gezeigt werden, dass *Gphxt1* einen pilzlichen Ursprung hat. Theoretisch wäre es möglich gewesen, dass *Gphxt1* durch eine Kontamination in die Hefeexpressions-cDNA-Bank gelangt ist. Durch reproduzierbare PCR-

Amplifikation von *Gphxt1*-Fragmenten mit den genspezifischen Primern Y13-U2/Y13-L3 und *Geosiphon*-DNA (genomisch und cDNA) als Template (und deren Sequenzierung) konnte das Resultat aus der phylogenetischen Analyse weiter bestätigt werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

4.3 Physiologische und molekulare Charakterisierung des putativen Zuckertransporters GpHXT1p von *Geosiphon pyriformis*

GpHXT1p gehört zur so genannten „major facilitator superfamily“ (MFS). Die MFS-Transporter bestehen aus einem einzelnen Polypeptid, funktionieren als Uniporter, Symporter oder Antiporter, und besitzen zumeist (mit Ausnahmen) 12 TMH (Marger und Saier, 1993). Obwohl als Modell für den Nährstoffaustausch in der Ektomykorrhiza ein Antiport von Kohlenhydrat und Phosphat schon einmal vorgeschlagen wurde (Woolhouse 1975; Schwab et al., 1991), wird für die arbuskuläre Mykorrhiza angenommen, dass für den Austausch dieser Nährstoffe getrennte Transportsysteme existieren (Hause und Fester, 2005). Die Möglichkeit des Antiports wurde somit bei der weiteren Untersuchung von GpHXT1p nicht berücksichtigt. Zwei mögliche Mechanismen des Substrattransportes über GpHXT1p wurden angenommen: Der erste Mechanismus ist die erleichterte Diffusion (Uniport). Das Protein transportiert dabei selektiv bestimmte Substrate entlang ihres Gradienten. Voraussetzung ist ein in Transportrichtung fallender Gradient des Substrates. Ein Transport gegen den Substratgradienten ist nicht möglich. Der zweite Mechanismus ist der sekundär aktive Substrattransport im Symport mit Protonen. Bei AM-Symbiosen konnte bereits eine Ansäuerung des periarbuskulären Raumes durch H^+ -ATPasen nachgewiesen werden (Gianinazzi-Pearson et al., 1991; Guttenberger, 2000). Somit wurde auch für GpHXT1p angenommen, dass ein eventueller Substrat-Symport mittels Protonen erfolgt. Die Energie liefert dabei ein Gradient für Protonen über die Membran. Der Aufbau dieses Gradienten erfolgt unter Verbrauch von Energie und wird durch H^+ -ATPasen von der Pflanze bewerkstelligt. Die erleichterte Diffusion hingegen erfolgt ohne Energieverbrauch.

Mit den im Folgenden diskutierten Untersuchungen sollte herausgefunden werden, welche Art von Substraten und mit welchem der beiden Mechanismen GpHXT1p Substrate transportiert. Durch ein weiteres Experiment sollte herausgefunden werden, ob die Expression von *Gphxt1* in *Geosiphon pyriformis* im Licht bzw. im Dunkeln unterschiedlich reguliert wird.

4.3.1 Untersuchungen zur Substratspezifität von GpHXT1p

Wachstumstests mit verschiedenen Zuckern bzw. Zuckerderivaten

Zur Untersuchung der Substratspezifität von GpHXT1p wurden mit *Gphxt1*-transformierten EBY VW4000-Mutanten Wachstumstests auf Agar- und in Flüssigmedien durchgeführt. Bei den Wachstumstests auf Agarmedien zeigte sich zunächst, dass die Mutante HMY13-S12 nur auf den Hexosen D-Mannose, D-Glukose, D-Fruktose, D-Galaktose und auf dem

Disaccharid D/L-Maltose wachsen konnte. Auf den untersuchten Pentosen sowie den Zuckerderivaten myo-Inositol und N-Azetyl-Glukosamin wurde kein Wachstum beobachtet. Der zur Kontrolle auf die Substrate D-Mannose, D-Glukose, D-Fruktose, D-Galaktose, und D/L-Maltose plattierte EBY VW4000 Klon HMY14-1 (mit Kontrollvektor pDR196SFI-K transformiert) konnte erwartungsgemäß nur auf Maltose wachsen. Ob einige der Substrate über GpHXT1p zwar aufgenommen, anschließend aber nicht metabolisiert wurden, kann anhand der Resultate dieser Experimente nicht beurteilt werden. Das Wachstum auf Maltose und Saccharose kann als Positivkontrolle gewertet werden, da durch die Mutationen in EBY VW4000 nur der Hexosetransport deaktiviert ist. Anhand der Stärke des Wachstums mit dem jeweils getesteten Substrat (Koloniegröße oder OD₆₀₀) konnte eine putative Reihenfolge für die Substratpräferenz von GpHXT1p erstellt werden: D-Mannose>D-Glukose>>D-Galaktose>D-Fruktose. Alle Versuche auf Agarmedien wurden mit 22 mM Substratkonzentration durchgeführt. Überraschenderweise verbesserte sich das Wachstum mit D-Fruktose in Flüssigmedien deutlich ab einer Konzentration von über 25 mM bis 150 mM. Bei hohen Substratkonzentrationen ergab sich für die putative Substratpräferenz eine veränderte Reihenfolge: D-Mannose>D-Glukose>D-Fruktose>>D-Galaktose. Warum sich das Wachstum mit D-Fruktose ab einer bestimmten Konzentration deutlich verbessert, konnte nicht abschließend geklärt werden. Möglicherweise spielen dabei sowohl die Transportkinetik von GpHXT1p als auch metabolische Prozesse in der Hefe eine Rolle. Denkbar wäre, dass sich beim D-Fruktosetransport ab einer bestimmten Konzentration die Aufnahmekinetik von GpHXT1p ändert. Bei Zuckertransportern von *Saccharomyces cerevisiae* wurde eine solche „biphasische“ Aufnahmekinetik bereits beschrieben (Özcan und Johnston; 1999; Reifenberger et al., 1997). Anhand der Ergebnisse dieser Wachstumsexperimente kann nun aber nicht direkt auf die Substratpräferenz von GpHXT1p geschlossen werden. Es ist denkbar, dass einige der Substrate zwar gut in die Hefe transportiert, dann aber nur schlecht metabolisiert werden. Dies zeigt sich dann, trotz gutem Transport des Substrates, als schwächeres Wachstum. Die hier aufgestellte Reihe der putativen Substratpräferenzen von GpHXT1p sollte daher durch Substrat-Aufnahmemessungen in *Gphxt1*-transformierte Hefe mit den tatsächlichen Transportraten für die untersuchten Substrate verglichen werden.

Substratkompetition mit D-Glukose

Bei diesem Experiment wurden die Aufnahmeraten für D-Glukose in *Gphxt1*-transformierte EBY VW4000-Klone in Gegenwart von Substratkompetitoren bestimmt. Dazu war ein Anteil der jeweils zugesetzten Glukosemenge mit ¹⁴C markiert. Es sollte geprüft werden, ob die bei den Wachstumstests ermittelte, putative Reihenfolge der Substratpräferenzen von GpHXT1p auch mit der tatsächlichen Transportstärke übereinstimmt. Nach den Ergebnissen der Wachstumstests auf Agar- und Flüssigmedien (für Substratkonzentrationen <50 mM) kann

man die Stärke des Hexosetransports über GpHXT1p in möglicherweise in folgender Reihenfolge einordnen:

D-Mannose>D-Glukose>>D-Galaktose>D-Fruktose (1)

Für eine (theoretische) Substratkonzentration von >50 mM ergab sich bei den Tests mit Flüssigmedien eine veränderte Reihenfolge:

D-Mannose>D-Glukose>D-Fruktose>>D-Galaktose (2)

Anhand der Resultate der Aufnahmemessungen unter Substratkompetition könnte, unter Berücksichtigung der hohen Standardabweichungen, sowohl (1) als auch (2) bestätigt werden. Da aber die getesteten Substrate mit einer Konzentration von 375 mM eingesetzt wurden, kann die Substratreihenfolge 2 als das wahrscheinlichere Ergebnis angesehen werden. Somit würde die bereits im vorhergehenden Abschnitt vermutete Veränderung der Aufnahmekinetik von GpHXT1p für D-Fruktose bestätigt werden. Um dies zu bestätigen, müssten Aufnahmemessungen unter Kompetition mit Substraten in einer Konzentration < 50 mM durchgeführt werden. Anhand der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse kann somit noch keine abschließende Aussage über die Substratpräferenz von GpHXT1p getroffen werden. Das Substratspektrum selbst kann aber als relativ sicher angesehen werden. Dieses findet man in ähnlicher Form auch bei Hexosetransportern verschiedener anderer Pilze wieder. So transportieren zum Beispiel die Hexosetransporter in *Saccharomyces cerevisiae* Glukose, Mannose, Fruktose und Galaktose (Reifenberger et al., 1997). Der in Haustorien von *Uromyces fabae* identifizierte Hexosetransporter *HXT1* (Voegelé et al., 2001) transportiert ebenfalls Mannose, Glukose, Fruktose und in sehr geringem Maß auch Galaktose (siehe Tabelle 11).

4.3.2 Untersuchung zum Einfluss von Licht auf die Expression von *Gphxt1*

Durch ein RT-PCR-Experiment mit verschieden lange im Licht bzw. im Dunkel inkubierten *Geosiphon*-Blasen wurde untersucht, ob die Expression von *Gphxt1* unter diesen Bedingungen reguliert wird. Es ergaben sich Hinweise, dass mit zunehmender Lichtdauer (bei einer Zeitreihe von 0 bis 72 h Licht) eine Steigerung der *Gphxt1*-Expression erfolgt. Nach einer Inkubation von 72 h im Dunkel ließ sich keine cDNA von *Gphxt1* mehr nachweisen. Die Kontrolle zeigte, dass die Menge an cDNA in den Ansätzen gleich verteilt war. Diese Resultate lassen vermuten, dass GpHXT1p im Licht stärker als im Dunkel exprimiert wird. Der Grund für eine solche Regulation könnte eine Umstellung in der *Geosiphon*-Blase auf einen „Dunkelstoffwechsel“ sein wie er im unterirdisch wachsenden Myzel herrschen dürfte. Denkbar wäre aber auch, dass in *Geosiphon pyriformis* zwei verschiedene Hexosetransportsysteme existieren. Und zwar eines mit hoher („high-affinity“) und eines mit niedriger Affinität („low-affinity“) zum transportierten Substrat. Die Expression des (putativen) „low-affinity“-Transporters GpHXT1p würde dann im Dunkeln zu Gunsten eines noch unbekannten „high-affinity“-Transporters herunterreguliert. Das mögliche

Vorkommen eines „high-affinity“-Transporters in *Geosiphon* wurde bereits unter 4.2 diskutiert. Für den Zuckertransport in *Saccharomyces cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass bei geringer Zuckerkonzentration im Außenmedium „high-affinity“-Transporter, bei hoher Zuckerkonzentration jedoch „low-affinity“-Transporter exprimiert werden (Lalonde et al., 1999). In Hefe ergibt die Expression verschiedener Transportsysteme einen Sinn, da dieser Organismus in der Natur stark schwankenden Nährstoffkonzentrationen ausgesetzt ist. Diese Bedingungen können dabei auch längere Zeit bestehen bleiben. Ob in der *Geosiphon*-Symbiose das Angebot von Zuckern für den Pilz ähnlichen Schwankungen unterliegt, kann nur vermutet werden. Eine der Bedingungen, welche die Photosynthese von *Nostoc* und somit auch die Verfügbarkeit von Zuckern für *Geosiphon* beeinflusst, ist der Tag/Nachtrhythmus. Möglicherweise spielen aber auch Schwankungen der Lichtintensitäten während der Jahreszeiten eine Rolle. Dabei könnte man z.B. an die Beschattung des natürlichen Habitats im Sommer durch Laubbäume und entsprechend höhere Lichteinwirkung im Frühjahr und Herbst denken. Die Expression zweier verschieden affiner Transportsysteme ist zwar denkbar, kann beim momentanen Stand der Arbeit aber noch nicht bewiesen werden. Dabei ist auch zu bedenken, dass eine Anpassung an verschiedene Zuckerkonzentrationen auch allein durch die unterschiedlich starke Expression eines Transportsystems erfolgen kann. Abschließend bleibt noch anzumerken, dass dieses Experiment bislang nur einmal durchgeführt wurde. Um weitere Aussagen treffen zu können, müsste es mehrmals mit demselben Resultat reproduziert werden.

4.3.3 Untersuchungen zum Transportmechanismus

Mit den im Folgenden diskutierten Experimenten sollte der Mechanismus des Substrattransports über GpHXT1p untersucht werden. In Betracht gezogen wurden der Protonen-Symport und die erleichterte Diffusion (Uniport). Ein erster Hinweis auf den Mechanismus des Substrattransportes ergab sich aus der Analyse der Aminosäuresequenzen der TMH. Bei Mitgliedern der MFS die als Protonen-Symporter funktionieren, nicht aber bei denen die als Uniporter funktionieren, sind am Beginn der AS-Sequenz von TMH Nr. 6 zwei AS konserviert (Bush 1993). Dies sind Tryptophan (W) und Arginin (R) oder Lysin (K). Die TMH Nr. 5 der 11 TMH-Variante von GpHXT1p bzw. die TMH Nr. 6 (im Falle der 12 TMH-Variante) beginnt mit der AS-Sequenz WR. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass es sich bei GpHXT1p um einen Protonen-Symporter handeln könnte.

pH-Messungen in Hefesuspensionen

Durch pH-Messungen von Zellsuspensionen des mit *Gphxt1*-transformierten EBY VW4000-Klons HMY13-S12 sollte der Transportmechanismus von GpHXT1p untersucht werden. Wenn GpHXT1p sein Substrat im Symport mit Protonen transportiert, sollte der pH des Mediums bei Zugabe von Substrat messbar basischer werden. Im Anschluss daran sollte der

pH-Wert saurer werden, da bei Hefen in Gegenwart von metabolisierbaren Zuckern, schnell H^+ -ATPasen stimuliert werden die das extrazelluläre Medium ansäuern. (Nobuaki et al., 1996). Dies dient der Verbesserung der Nährstoffaufnahme durch Protonen-Symporter und der Verbesserung des Zellwachstums da die Turgorstreckung der Zellwände in saurem Medium erleichtert wird. Nach der Zugabe der von GpHXT1p transportierten Substrate D-Glukose und D-Mannose wurde daher ein kurzfristiger pH-Anstieg erwartet. Ein solcher pH-Anstieg konnte jedoch nach Zugabe potentieller Substrate für GpHXT1p (D-Mannose und D-Glukose) nicht beobachtet werden. Auch die zur Kontrolle zugegebenen Testsubstanzen (H_2O , L-Glukose, L-Rhamnose und D-Arabinose und D/L-Maltose) beeinflussten den pH-Wert nicht. Bei den Kontroll-Messungen mit dem EBY VW4000-Klon HMY14-1 (mit Kontrollvektor pDR196SFI-K transformiert) zeigte allerdings die Zugabe von Maltose einen solchen, kurzfristigen pH-Anstieg. Bei HMY13-S12 konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Dies liegt daran, dass in *Saccharomyces cerevisiae* die Expression der Proteine für den Maltosetransport in Gegenwart von Glukose reprimiert werden. (Medintz et al., 1996). Da die Klone HMY13-S12 und HMY14-1 vor den pH-Messungen mit Glukose bzw. Maltose angezogen wurden und der Maltosetransport in *Saccharomyces* durch Protonen-Symport erfolgt (Jansen et al., 2004) kann diese Beobachtung einfach erklärt werden und dient als Positivkontrolle für die Messungen. Die pH-Messungen ergaben somit keine Hinweise auf einen Protonen-Symport als Transportmechanismus von GpHXT1p. Dies könnte an den zu geringen pH-Änderungen gelegen haben. Eine weitere Möglichkeit könnte sein, dass die zur Messung verwendete Hefezellsuspension zu schwach konzentriert war und eventuelle pH-Schwankungen somit nicht messbar waren. Daher wurden die im Folgenden diskutierten Experimente mit *Xenopus*-Oozyten durchgeführt.

Plasmamembran-Potentialmessungen in *Xenopus*-Oozyten

Um den Transportmechanismus von GpHXT1p weiter zu untersuchen, wurde GpHXT1p nach cRNA-Injektion von *Gphxt1* in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert. Mit diesen Zellen wurden anschließend Plasmamembran-Potentialmessungen durchgeführt. Es wurde erwartet, dass die Zugabe von D-Glukose zum Inkubationsmedium der Oozyte zu einer messbaren Depolarisierung des normalerweise negativen Membranpotentials führt. Von insgesamt 40 gemessenen Zellen zeigten nur drei (8 %) diesen Effekt. Diese Resultate bestätigten zunächst die Vermutung eines Glukose-Protonen-Symports über GpHXT1p. Da allerdings nur 8 % der Zellen wie erwartet reagierten, kann dieses Ergebnis nicht als alleiniger Beweis für diese Vermutung dienen. Die schlechte Reproduzierbarkeit ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die injizierte cRNA aus verschiedenen Gründen von vielen Oozyten nicht korrekt translatiert wurde. Somit lag in der Membran der meisten Zellen kein Zuckertransporter vor, welcher die erwarteten Potentialänderungen hätte hervorrufen können. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass das Protein zwar in der Membran

vorlag, aber nicht funktionell war. Die injizierte cRNA war möglicherweise aus verschiedenen Gründen nicht optimal für die Expression in Oozyten geeignet:

1.) Bei der *in vitro*-Synthese der *Gphxt1*-cRNA wurden statt einem Hauptprodukt mehrere Produkte verschiedener Länge erhalten (3000, 2100, 1200 und 900 bp, siehe **3.3.4**). Erwartet wurde jedoch ein einzelnes Produkt von ca. 2100 bp Länge. Dies könnte zunächst an einer unzureichenden Denaturierung der cRNA-Probe für die Agarosegelanalyse gelegen haben. Eine weitere Möglichkeit ist, dass im *in vitro*-Transkriptionsansatz noch ein Rest des ungeschnittenen Vektors vor. Somit wäre es möglich, dass die RNA-Polymerase auf diesem geschlossenen Vektor im Kreis gelaufen ist und eine Reihe von Transkripten unterschiedlicher Länge produzierte. Bei der dann in die Oozyten injizierten cRNA könnte das korrekte Produkt so unterrepräsentiert gewesen sein, dass die *in vivo* Translation fehlgeschlagen ist.

2.) Die Sequenzierung des zur cRNA-Synthese verwendeten Vektors pOO2::*Gphxt1* ergab, dass die darin enthaltene polyA-Sequenz nur ca. 20 statt der 130, in der Vektorkarte verzeichneten Adenin-Nukleotiden besaß. Die Länge des polyAs einer mRNA beeinflusst aber sowohl deren Stabilität als auch die Effizienz mit der sie translatiert wird (Krieg et al., 1984; Drummond et al., 1985; Gillian-Daniel et al., 1998). Möglicherweise wurde die injizierte cRNA in der Oozyte abgebaut oder nur ineffizient translatiert.

3.) Eine weitere Fehlerquelle könnte die Präsenz der 5'- und 3'-UTRs aus *Geosiphon* in der *Gphxt1*-cRNA gewesen sein. Möglicherweise interagieren regulatorische Elemente in diesen UTRs mit dem Translationsapparat der Oozyte und verhindern eine effiziente Expression des funktionellen Proteins.

4.) Die cDNA von *Gphxt1* ist möglicherweise trunziert (siehe **4.2**). Da in Hefe das Protein offenbar funktionell exprimiert wird, könnte es sein, dass Hefen, nicht aber Oozyten diesen Defekt kompensieren können. Bei Hefen könnte ein Teil des hydrophoben Abschnitts im N-Terminus als zwölfte TMH in die Plasmamembran inseriert werden. Sollte dies in Oozyten nicht funktionieren, so könnte dies zu einem funktionsunfähigen Protein führen (sofern diese zwölfte TMH essentiell für die Funktion von GpHXT1p ist). Denkbar wäre auch, dass in der trunzierten cRNA die Signalsequenz zum Einbau des Proteins in die Zellmembran fehlt.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass zwar nur ein geringer Prozentsatz an Oozyten Reaktionen zeigte die auf einen Protonen-Symport als Transportmechanismus von GpHXT1p schließen lassen. Die wenigen Reaktionen waren allerdings eindeutig und reproduzierbar. Somit sind vermutlich methodische Mängel die Ursache für die insgesamt schlechte Reproduzierbarkeit dieses Experiments.

Aufnahmemessungen in Gegenwart von ATPase-Hemmstoffen und Entkopplern

Bei diesem Experiment wurden die Aufnahmeraten für D-Glukose in *Gphxt1*-transformierte EBY VW4000-Klone in Gegenwart von ATPase-Hemmstoffen und Entkopplern bestimmt. Dazu war ein Anteil der jeweils zugesetzten Glukosemenge mit ^{14}C markiert. Um herauszufinden, ob der Substrattransport über GpHXT1p im Symport mit Protonen erfolgt, wurde gemessen, ob und wie sich die Aufnahmeraten für Glukose in Gegenwart verschiedener Hemmstoffe, welche indirekt die Funktion von GpHXT1p beeinträchtigen, ändern. Als Hemmstoffe wurden Entkoppler (CCCP und DNP, diese zerstören einen an der Zellmembran vorhandenen Protonengradienten) und ATPase-Hemmstoffe (DES und Vanadat, diese verhindern den Aufbau eines Protonengradienten an der Zellmembran) verwendet. Die Gegenwart der Entkoppler CCCP und DNP reduzierte die Aufnahmeraten auf unter 20 %, die von Vanadat auf ca. 70 % vom Standardwert. DES scheint den Substrattransport über GpHXT1p völlig zu blockieren. Die Resultate aus diesem Experiment zeigen, dass das Fehlen eines Protonengradienten über die Zellmembran den Transport von D-Glukose über GpHXT1p unterbindet. Da die erleichterte Diffusion unabhängig von einem Protonengradienten ist, scheidet sie als Transportmechanismus von GpHXT1p aus. Somit kann, zusammengefasst mit den Ergebnissen aus der TMH-AS-Sequenzenuntersuchung (siehe Anfang dieses Kapitels) und den Potentialmessungen mit Oozyten angenommen werden, dass der Substrattransport über GpHXT1p im Symport mit Protonen erfolgt.

Untersuchung der Aufnahmekinetik

Mit diesem Experiment wurde die Kinetik der Glukoseaufnahme über GpHXT1p untersucht. Gemessen wurde, wie sich die Aufnahmerate für D-Glukose in *Gphxt1*-transformierte EBY VW4000-Klone in Gegenwart von Abhängigkeit der Glukosekonzentration ändert (Michaelis-Menten Kinetik). Dazu war ein Anteil der jeweils zugesetzten Glukosemenge mit ^{14}C -Glukose markiert. Aus der Michaelis-Menten-Kurve wurde der Wert für V_{\max} mit etwa $0,12 \text{ nmol Glukose} \cdot 10^{-5} \text{ Zellen} \cdot \text{min}^{-1}$ und ein K_M von ca. 40 mM Glukose abgeleitet. Anhand der Gleichung der nach Lineweaver-Burk linearisierten Michaelis-Menten-Kurve wurden die Werte für V_{\max} ($0,18 \text{ nmol Glukose} \cdot 10^{-5} \text{ Zellen} \cdot \text{min}^{-1}$) und K_M (76 mM D-Glukose) rechnerisch ermittelt. Die jeweils ermittelten Werte für K_M und V_{\max} weichen jedoch relativ stark voneinander ab. Dies liegt daran, dass aufgrund der relativ hohen Fehlerbalken in der Michaelis-Menten Kurve der Sättigungsbereich und somit V_{\max} nur schlecht abgeschätzt werden konnte. Ähnliches gilt für die Gerade des Lineweaver-Burk-Diagramms. Auch hier sind die Fehlerbalken zum Teil relativ groß. Bereits kleinere Schwankungen in der Steigung der Ausgleichsgeraden verändern die Werte für K_M und V_{\max} jedoch bereits relativ stark. Es kann aber angenommen werden, dass zumindest die Größenordnungen der beiden Werte stimmen. Um einen ungefähren Anhaltspunkt für die beiden Werte zu erhalten wurde jeweils der Mittelwert gebildet:

$V_{\max} = 0,15 \text{ nmol D-Glukose} \cdot 10^{-5} \text{ Zellen} \cdot \text{min}^{-1}$; $K_M = 58 \text{ mM D-Glukose}$. Daraus lässt sich schließen, dass es sich bei GpHXT1p um einen „low-affinity“-Transporter handelt. Dies unterstützt die Vermutungen, welche unter 4.2 bei der AS-Sequenzanalyse von GpHxt1p und unter 4.3.2 bei der Untersuchung zum Einfluss von Licht auf die Expression von *Gphxt1* angestellt wurde. Beim Vergleich des K_M -Wertes von GpHXT1p mit den entsprechenden Werten vergleichbarer pilzlicher Transporter (siehe Tabelle 11) fällt nun aber auf, dass diese Transporter zum Teil eine deutlich höhere Affinität zu D-Glukose aufweisen. Das extrazelluläre Kompartiment in der Umgebung einiger dieser Transporter kann aber, zumindest in Bezug auf die Nährstoffkonzentrationen welche dort herrschen dürften, durchaus mit denen im Symbiosom verglichen werden. So dient AmSt1 dem Ektomykorrhizapilz *Amanita muscaria* dazu, von der Pflanze abgegebene Zucker im Bereich des Hartig'schen Netzes aufzunehmen. HXT1p wird von dem pathogenen Pilz *Uromyces fabae* dazu verwendet um der befallenen Pflanze entzogene Zucker in sein Haustorium aufzunehmen. Es stellt sich nun die Frage warum GpHXT1p im Vergleich zu den vorgehend genannten Transportern eine wesentlich geringere Substrataffinität aufweist. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre z. B., dass im Symbiosom möglicherweise eine deutlich höhere Zuckerkonzentration als z. B. in einem Haustorium oder im Hartig'schen Netz herrscht. Im Hartig'schen Netz könnten sich die von der Pflanze abgegeben Nährstoffe, aufgrund des relativ offenen Kompartiments, schnell verdünnen. In der pathogenen Interaktion zwischen *Uromyces* und seinem Wirt gibt die Pflanze eventuell wesentlich weniger Zucker ab, als es in der symbiotischen Interaktion zwischen *Geosiphon* und *Nostoc* geschieht. Dass die Werte für V_{\max} und K_M von GpHXT1p prinzipiell aber im Rahmen der Werte anderer Zuckertransporter liegen zeigt der Vergleich mit HXT2 aus *Saccharomyces cerevisiae*. Dieser Transporter besitzt eine Substrataffinität in vergleichbarer Größenordnung, ist aber Teil eines „low-affinity“-Transportsystems welches in Hefe unter relativ hohen Substratkonzentrationen exprimiert wird (Kruckeberg 1996; Reifenberger et al., 1997). Die besten Vergleichswerte für die Aufnahmekinetik von GpHXT1p würde vermutlich ein, noch nicht bekannter, im Arbuskel eines AM-Pilzes exprimierter Zuckertransporter liefern. Es ist vorstellbar, dass im Symbiosom und im Arbuskel ähnliche Verhältnisse in Bezug auf die Zuckerkonzentrationen herrschen.

Tabelle 11: Vergleich von Substratspektrum und K_M -Wert von GpHXT1p mit den Werten von Zuckertransportern anderer Pilze.

Ursprung	Transporter	K_M (D-Glukose)	Substratspektrum	Referenz
<i>Aspergillus nidulans</i>	MSTA	25 μ M	D-Glukose D-Mannose D-Fruktose D-Xylose	van Kuyk et al., 2004
<i>Amanita muscaria</i>	AmMst1	460 μ M	D-Glukose D-Fruktose D-Mannose D-Galaktose Glukosamin	Wiese et al., 2000
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HXT2	100 mM	D-Glukose D-Mannose D-Fruktose	Reifenberger et al., 1997
<i>Geosiphon pyriformis</i>	GpHXT1p	60 mM	D-Glukose D-Mannose D-Fruktose D-Galaktose	diese Arbeit
<i>Uromyces fabae</i>	HXT1p	360 μ M	D-Glukose D-Mannose D-Fruktose D-Galaktose	Voegele et al., 2001

Die Werte für V_{\max} werden in der Literatur in der Einheit „nmol Glukose*mg Protein⁻¹*min⁻¹“ angegeben. Zur Umrechnung der Einheiten des V_{\max} -Wertes von GpHXT1p (nmol Glukose*10⁻⁵ Zellen*min⁻¹) zum Vergleich mit Literaturwerten, hätte mit den *Gphxt1*-transformierten EBY VW4000-Klone eine Messung der Proteinkonzentration durchgeführt werden müssen. Da eine solche Messung nicht erfolgt war, waren solche Vergleiche hier nicht möglich.

4.4 Überlegungen zur *in vivo* Funktion von GpHXT1p in *Geosiphon*-Symbiose und Vergleich mit der AM-Symbiose

Mit *Gphxt1* ist es in dieser Arbeit erstmals gelungen, die cDNA-Sequenz eines Hexosetransporters aus einem „AM-Pilz“ zu isolieren. Eine physiologische und molekulare Charakterisierung von GpHXT1p ergab, dass es sich dabei um einen „low-affinity“-Transporter ($K_M \sim 60$ mM) mit 11 oder 12 Transmembran-Helices und Protonen-Symport als Transportmechanismus handelt. Die Expression von *Gphxt1* ist im Licht bzw. im Dunkel möglicherweise differentiell reguliert. Abschließend soll diskutiert werden, wie die Funktion und Lokalisation von GpHXT1p *in vivo* aussehen könnte.

Die *Geosiphon*-Symbiose ist eine Endosymbiose zwischen dem Glomeromyceten *Geosiphon pyriformis* und Cyanobakterien der Gattung *Nostoc*. Die mikrosymbiotischen *Nostoc* befinden sich dabei im Inneren eines blasenartig vergrößerten Teils des Pilzmyzels und sind vollständig von der so genannten Symbiosomenmembran pilzlichen Ursprungs eingeschlossen. Dieses Kompartiment innerhalb der *Geosiphon*-Blase wird als Symbiosom bezeichnet. Zwischen beiden Symbionten muss ein reger Nährstoffaustausch erfolgen (Kluge et al., 1991). Dabei liefern die Cyanobakterien photosynthetisch erzeugte Kohlenhydrate und vermutlich auch fixierten Stickstoff an den Pilz. Im Gegenzug versorgt

dieser die Cyanobakterien mit anorganischen Nährstoffen. Im Symbiosom liegen die Plasmamembranen beider Symbionten, ähnlich wie beim Arbuskel in der AM-Symbiose, eng aneinander. Nährstoffe, welche über diese Kontaktfläche ausgetauscht werden, müssen also die Membranen beider Organismen überwinden. Es stellt sich nun die Frage, mit welchem Mechanismus dies geschehen könnte. Zwischen Symbiosom und Arbuskel bestehen strukturelle Ähnlichkeiten, die den Schluss zulassen, dass diese beiden „symbiotischen Organe“ ähnliche Funktionen besitzen (Schüßler und Kluge, 2001) und als homolog angesehen werden können (Schüßler et al., 1996). Somit ist wahrscheinlich, dass der Nährstoffaustausch am Symbiosom nach ähnlichen Mechanismen wie im Arbuskel erfolgt. Bei der AM-Symbiose werden die Nährstoffe (hauptsächlich Phosphat und Kohlenhydrate) zunächst in den periarbuskulären Raum abgegeben. Ob dies durch aktiven Auswärtstransport oder passive Diffusion erfolgt, wird noch diskutiert. Wahrscheinlich ist aber, dass die Aufnahme der Nährstoffe in die Symbionten durch den Symport mit Protonen erfolgt. (Hause und Fester, 2005; Smith et al., 1994). Dazu muss zunächst ein Protonengradient über die Membran aufgebaut werden. Dies geschieht durch H^+ -ATPasen, welche den interzellularen Raum um den Arbuskel bzw. um das Symbiosom ansäuern. Eine solche Ansäuerung des Apoplasten im Bereich um die Arbuskel konnte bereits gezeigt werden. (Guttenberger 2000). Die dazu notwendigen H^+ -ATPasen konnten bisher nur auf Pflanzenseite nachgewiesen werden (Gianinazzi-Pearson et al., 2000). Für den Bereich um das Symbiosom kann eine solche Ansäuerung nur vermutet werden. Durch die Etablierung eines pH-Gradienten über eine Zellmembran entsteht, nach der chemiosmotischen Theorie (Mitchell 1961, 1963) eine Kraft, die so genannte „proton motive force“ (Δp). Diese wird durch die Formel $\Delta p = \Delta \Psi - Z \cdot \Delta pH$ [mV] beschrieben und setzt sich aus einem elektrischen Gradienten ($\Delta \Psi$ = Potentialdifferenz zwischen Zytoplasma und Außenmedium), einem chemischen Gradienten (ΔpH = pH-Differenz zwischen Zytoplasma und Außenmedium) und einer Konstanten ($Z = 59$ mV bei 25°C) zusammen. Beim sekundär aktiven Transport werden, unter Ausnutzung von Δp , Protonen entlang des chemiosmotischen Gradienten über die Zellmembran transportiert. Die Energie von Δp reicht aus, um Substrate im Symport mit Protonen, auch gegen den Substratgradienten, über die Zellmembran zu transportieren. In der AM-Symbiose konnte ein solcher für die Aufnahme von Zucker in den Pilz erforderlicher und im Arbuskel lokalisierter Zuckertransporter bislang jedoch nicht isoliert werden. Anhand der bereits erwähnten Ähnlichkeiten zwischen AM- und *Geosiphon*-Symbiose kann nun aber angenommen werden, dass der hier isolierte Hexosetransporter GpHXT1p in *Geosiphon* dazu dient, die von *Nostoc* abgegebenen Kohlenhydrate aufzunehmen. Welcher Art diese Kohlenhydrate sind, ist jedoch noch unklar. Von Flechten-Symbiosen mit Cyanobakterien ist bekannt, dass diese Glukose (Rai und Bergmann 2002) oder Glukane (Honegger 1991) abgeben. Die Glukane werden von pilzlichen Glukanasen zu Glukose umgesetzt, welche

dann vom Pilz aufgenommen werden kann. Es konnte auch gezeigt werden, dass frei lebende *Nostoc* extrazelluläre Schleime produzieren, welche mannosehaltige Glukane enthalten (Kluge et al., 2002). Es kann spekuliert werden, ob nicht auch die im Symbiosom lebenden *Nostoc* diese extrazellulären Schleime produzieren und ob die darin enthaltene Mannose von *Geosiphon* zur Ernährung genutzt wird. Mit einiger Sicherheit kann behauptet werden, dass im Fall der *Geosiphon*-Symbiose Kohlenhydrate in Form von Hexosen ausgetauscht werden. In der AM-Symbiose konnte für die Pilzseite gezeigt werden, dass die Aufnahme von Kohlenhydraten in Form von Hexosen erfolgt (Shachar-Hill et al., 1995; Solaiman und Saito, 1997; Bago et al., 2003). Es wird vermutet, dass es sich dabei hauptsächlich um Glukose und Fruktose handelt (Saito et al., 1995; Shachar-Hill et al., 1995; Pfeffer et al., 1999; Requena und Breuninger 2004). Zudem konnte gezeigt werden, dass im periarbuskulären Raum die Bestandteile einer primären Zellwand abgelagert werden. Diese enthält Glukane, welche aus Monosacchariden aufgebaut sind (Requena und Breuninger, 2004). Auch hier kann spekuliert werden, inwieweit diese Zucker bei der Ernährung des AM-Pilzes eine Rolle spielen. Die Untersuchungen zur Substratspezifität von GpHXT1p (siehe 4.3.1) ergaben, dass dieser Transporter in der Lage ist, die Hexosen D-Mannose, D-Glukose, D-Fruktose und D-Galaktose zu transportieren. Somit liegt der Schluss nahe, dass GpHXT1p *Geosiphon* zur Aufnahme der von *Nostoc* bereitgestellten Photosyntheseprodukte dient. Dazu muss zunächst davon ausgegangen werden, dass GpHXT1p in der Symbiosomenmembran lokalisiert ist. Eine Lokalisation von GpHXT1p an anderen Stellen als im Symbiosom kommt aber wahrscheinlich nicht in Betracht, da gezeigt werden konnte, dass *Geosiphon*-Blasen keine Hexosen aus dem Außenmedium aufnehmen (Schübler et al., 1995; Schübler und Kluge, 2001). Inwiefern dieses Resultat auf das gesamte Myzel übertragbar ist, ist jedoch nicht bekannt. Die unter 4.3.2 bei der Untersuchung zum Einfluss von Licht auf die Expression von *Gphxt1* diskutierten Resultate zeigen, dass in Blasen, welche längere Zeit im Dunkeln inkubiert werden, die Expression von GpHXT1p möglicherweise eingestellt wird. Nun kann man vermuten, dass im Dunkeln in der Blase ein Stoffwechsel wie im Myzel (welches in den oberen Bodenschichten mehr oder weniger im Dunkeln wächst) herrscht. Somit spricht auch dieses herunterregulieren der Expression von *Gphxt1* für eine ausschließliche Lokalisation von GpHXT1p in der Blase. Auch für AM-Pilze konnte gezeigt werden, dass das extraradikale, also nicht direkt an den symbiotischen Interaktionen beteiligte Myzel, nicht in der Lage ist Zucker aus dem Außenmedium aufzunehmen (Pfeffer et al., 1999). Bei der AM-Symbiose werden die aufgenommen Hexosen im intraradikalen Myzel sofort zu Lipiden (Triacylglyzeride), Glykogen und Trehalose umgesetzt (Shachar-Hill et al., 1995; Pfeffer et al., 1996; Bago et al., 2003) und anschließend in das extraradikale Myzel transportiert. In der *Geosiphon*-Symbiose dürften die aufgenommenen Hexosen in ähnlicher Weise umgesetzt werden, zumindest kann man

im unteren Drittel älterer Blasen eine deutliche Ansammlung von Lipiden erkennen (siehe Abb. 4). Eine schematische Darstellung des Stoffaustausches in der *Geosiphon*- bzw. in der AM-Symbiose ist in Abb. 63 dargestellt. Gezeigt ist auch, welche Funktion GpHXT1p bei der Aufnahme von Kohlenhydraten in *Geosiphon* erfüllen könnte.

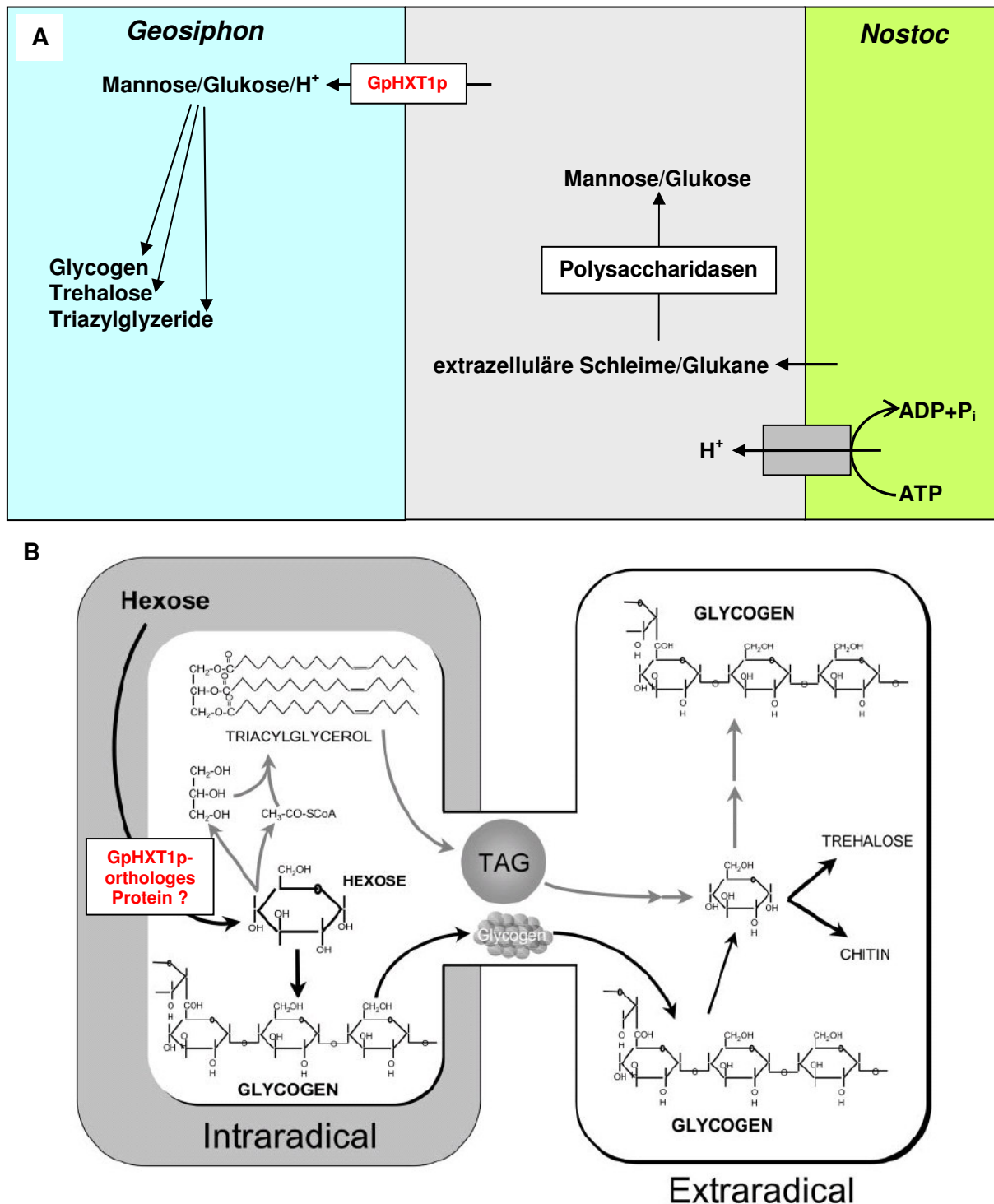


Abb. 63: Schematische Darstellung des Nährstoffaustausches an den symbiotischen Kontaktflächen. A: *Geosiphon*-Symbiose; B: AM-Symbiose. Im Schema für die *Geosiphon*-Symbiose ist gezeigt, wie die Aufnahme von Zuckern über GpHXT1p in den Pilz erfolgen könnte.

Vieles spricht dafür, dass *Gphxt1* ein „Schlüsselgen“ für die Funktion der *Geosiphon*-Symbiose darstellt. Die weitere Untersuchung von *Gphxt1* und GpHXT1p bietet die Möglichkeit, weitere Einblicke in Etablierung und Funktion dieser Symbiose zu erhalten. Die als eines der Ziele der Arbeit erwähnte Isolierung eines Zuckertransporters aus *Geosiphon pyriformis* wurde somit erreicht. Durch die teilweise Charakterisierung von GpHXT1p auf molekularer und physiologischer Ebene konnte gezeigt werden, wie dieser an den molekularen Mechanismen des Kohlenhydrataustauschs zwischen *Nostoc* und *Geosiphon* beteiligt sein könnte. Die Kenntnis der cDNA-Sequenz von *Gphxt1* wird vermutlich zur Charakterisierung eines Zuckertransportes aus einem anderen AM-Pilz führen. Wenn es gelingt, einen solchen Transporter zu charakterisieren und im Arbuskel zu lokalisieren, so könnte der Beweis geführt werden, dass der Austausch von Hexosen tatsächlich am Arbuskel erfolgt.

4.5 Ansätze zur Weiterführung des Projekts

In dieser Arbeit wurden, im Vergleich zur früheren molekularen Erforschung von *Geosiphon pyriformis* vor allem zwei wesentliche Fortschritte erzielt:

- 1.) Es konnte erstmals eine cDNA-Bank aus dem „AM-Pilz“ *Geosiphon pyriformis* hergestellt werden.
- 2.) Aus dieser cDNA-Bank wurde als ein Schlüsselgen in der *Geosiphon*-Symbiose der Hexosetransporter *Gphx1* bzw. GpHXT1p isoliert und zumindest teilweise auf molekularer und physiologischer Ebene charakterisiert. Die Isolierung eines funktionellen Gens aus der hier hergestellten cDNA-Bank zeigt, dass diese Bank die Möglichkeit bietet, eine Reihe wichtiger Gene aus *Geosiphon* zu isolieren. Dies eröffnet auch die Möglichkeit, die entsprechenden Gene aus anderen AM-Pilzen zu isolieren. Somit ergibt sich eine Reihe von viel versprechenden Ansätzen zur Weiterführung des Projektes:

Isolation der kompletten genomischen Struktur von *Gphx1p*

Nach Abschluss der hier durchgeführten Arbeiten war nicht sicher, ob die isolierte cDNA-Sequenz von *Gphxt1* von einer am 5'-Ende teilweise degradierten mRNA abstammt. Dies kann erst nach der Isolation der kompletten genomischen Sequenz von *Gphxt1* beurteilt werden. Im Anschluß daran wird sich zeigen, ob von einer *Gphxt1*-mRNA mehrere Proteine exprimiert werden können. Im Anschluss daran können weitere Aussagen zur Struktur von GpHXT1p gemacht werden. Durch Expression und funktionelle Charakterisierung der verschiedenen Proteine in heterologen Systemen könnte dann auch gezeigt werden, ob diese verschiedene Funktionen besitzen.

Ob bei der heterologen Expression von *Gphxt1* in Hefen bzw. Oozyten GpHXT1p mit 11 oder 12 TMH in der Zellmembran vorliegt bzw. auf welcher Seite der Zellmembran die Termini lokalisiert sind, könnte mit einem einfachen Experiment getestet werden: Durch Klonierung

von *Gphxt1* in entsprechende Vektoren können Fusionsproteine mit alkalischer Phosphatase (oder anderer Marker) am N- oder C-Terminus hergestellt werden. Im Anschluss daran kann mittels einfacher Aktivitätstests festgestellt werden, wie die zu untersuchenden Termini im intra- oder extrazellulären Bereich lokalisiert sind. Ist in keinem Fall eine messbare Aktivität vorhanden, könnte dies darauf hindeuten, dass es sich um ein Protein mit 12 TMHs handelt.

Membran-Potentialmessungen mit *Xenopus*-Oozyten zur Untersuchung der Substratspezifität und Aufnahmekinetik von GpHXT1p

Nach Isolation der kompletten genomischen Sequenz von *Gphxt1* könnte eine genauere Aussage darüber getroffen werden, welches der Startcodons *in vivo* benutzt wird. Im Anschluss daran könnte, mittels entsprechender Primer und PCR, ein neues Template zur cRNA-Synthese hergestellt werden. Dieses sollte nur die Sequenz zwischen dem gewünschten Start- bzw. Stopcodon enthalten. Nach erneuter Klonierung in einen Oozytenvektor, cRNA-Synthese und Expression in *Xenopus*-Oozyten könnten die Membran-Potentialmessungen bessere Resultate liefern. Anhand der unterschiedlichen Depolarisation der Oozytenmembran als Reaktion auf unterschiedlich gut transportierte Substrate kann ein genaueres Substratspektrum von GpHXT1p erstellt werden. Durch Messung der Depolarisation in Abhängigkeit von der Substratkonzentration könnte der K_M -Wert alternativ zu den hier ermittelten Werten bestimmt werden.

Lokalisation von GpHXT1p *in vivo*

Durch Herstellung von GFP-Fusionsproteinen mit *Gphxt1* könnte die bisher nur vermutete Lokalisation von *Gphxt1* in der Symbiosomenmembran untersucht werden

Isolation weiterer Zuckertransporter aus *Geosiphon pyriformis*

Durch das Screening der Vollängen-cDNA-Bank mit Sonden welche aus *Gphxt1* zu entwickeln sind, können möglicherweise weitere Zuckertransporter aus *Geosiphon pyriformis* isoliert werden

Isolation weiterer, symbiosespezifischer Gene aus der hier erstellten cDNA-Bank

Mit *Gphxt1* wurde aus der in dieser Arbeit erstellten cDNA-Bank von *Geosiphon pyriformis* ein funktionelles Gen isoliert. Somit können, unter Anwendung verschiedener Methoden, relativ einfach weitere symbiosespezifische Gene aus *Geosiphon pyriformis* isoliert werden.

Versuch der Isolation eines Zuckertransporters aus anderen AM-Pilzen

Durch Ableitung degenerierter Primer aus der cDNA- bzw. genomischen Sequenz von *Gphxt1* kann mittels PCR-Isolation versucht werden, einen Zuckertransporter aus einem weiteren Vertreter der *Glomeromycota* zu isolieren.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich auf molekularer Ebene mit *Geosiphon*, einer bislang einzigartigen Endosymbiose zwischen einem Pilz (*Geosiphon pyriformis*) und dem Cyanobakterium *Nostoc punctiforme*. Das symbiontische Konsortium hat viele Ähnlichkeiten mit der arbuskulären Mykorrhiza und kann in mancher Hinsicht als Modell für diese dienen. In dieser Arbeit wurde ein Zuckertransporter, der möglicherweise am Nährstoffaustausch zwischen den Symbionten beteiligt ist, isoliert und teilweise charakterisiert.

Zu Beginn wurde eine verlässliche Methode zur Isolation von mRNA aus geringen Mengen an *Geosiphon*-Blasen entwickelt. Dabei wurde ein mRNA-Gehalt von ca. 0,2 ng pro Blase ermittelt. Weiter wurde ein Verfahren zur cDNA-Synthese etabliert. Klonierte cDNA-Sequenzen wurden sequenziert und zeigten eine sehr gute Qualität; z.B. zeigte keine der Sequenzen Homologien zu *Nostoc*-Genen. Pilzliche und bakterielle mRNA können somit durch die etablierten Methoden sehr effektiv getrennt werden.

Aufbauend auf den genannten Methoden wurde eine subtraktive cDNA-Bank hergestellt. Die verwendete cDNA wurde aus 72 h im Licht bzw. im Dunkeln inkubierten *Geosiphon*-Blasen gewonnen. 282 Klone der subtraktiven Bank wurden durch differentielles Screening nach Genen durchsucht, deren Expression lichtreguliert ist. Fünf solcher cDNA-Sequenzen wurden identifiziert; vier davon (*hm24-E11*, *hm24-H4*, *hm26-H3* und *hm27-F2*) zeigten schwache Ähnlichkeiten zu Transportproteinen bzw. Komponenten von Transportsystemen. Die Sequenz *hm26-H3* hatte schwache Ähnlichkeit zu einem Zuckertransporter eines Basidiomyceten. Die differentielle Expression dieser Gene im Licht, bzw. im Dunkeln, konnte durch unabhängige, semiquantitative RT-PCR Kontrollexperimente jedoch nicht bestätigt werden.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde aus *Geosiphon pyriformis* cDNA eine größenfraktionierte Hefeexpressions-cDNA-Bank mit $6 \cdot 10^5$ *E. coli*-Klonen hergestellt. Durch funktionelle Komplementation der Hefemutante EBY VW4000 mit Plasmiden dieser Bank wurde eine 1845 bp lange cDNA-Sequenz des Zuckertransportergens *Gphxt1* charakterisiert. Diese zeigte auf Aminosäureebene ca. 40 % Ähnlichkeit zu anderen Zuckertransportern. Aus der cDNA-Sequenz wurden drei offene Leserahmen (ORF) mit einer Länge von 432, 480, und 496 Aminosäuren (AS) abgeleitet. In den ORFs wurden konservierte Bereiche, sowie 11 bzw. 12 Transmembran-Helices identifiziert. Anhand dieser Ergebnisse wurde GpHXT1p in die „major facilitator superfamily“ (MFS) eingeordnet. Die cDNA-Sequenz des ORF mit 496 AS Länge beginnt ohne Startkodon, was darauf hinweist, dass die cDNA möglicherweise trunkiert ist. Die vermutete Vollängen-mRNA von *Gphxt1* könnte somit für mehrere funktionelle Zuckertransporter kodieren.

Wachstumstests mit heterolog exprimierenden Hefen ergaben, dass GpHXT1p das Wachstum der komplementierten Hefe in folgender Intensität ermöglicht:

Bei Substratkonzentrationen >50 mM D-Mannose>D-Glukose>D-Fruktose>>D-Galaktose.

Bei Substratkonzentrationen <50 mM D-Mannose>D-Glukose>>D-Galaktose>D-Fruktose.

Untersuchungen zum Transportmechanismus von GpHXT1p an heterolog exprimierenden Hefen bzw. Oozyten von *Xenopus laevis* zeigten, dass der Substrattransport im Symport mit Protonen erfolgt. Aufnahmemessungen mit ^{14}C -Glukose und der komplementierten Hefe ergaben folgende Werte für die Transportkinetik von GpHXT1p: $K_M = \text{ca. } 60 \text{ mM Glukose}$; $V_{\max} = \text{ca. } 0,15 \text{ nmol Glukose} \cdot 10^{-5} \text{ Zellen} \cdot \text{min}^{-1}$. GpHXT1p kann somit als „low-affinity“-Transporter klassifiziert werden. Durch ein RT-PCR-Experiment konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation von *Geosiphon*-Blasen von $\geq 72 \text{ h}$ im Dunkeln eventuell eine Verringerung der Expression von *Gphxt1* im Vergleich zu belichteten Proben bewirkt.

Gphxt1 könnte ein „Schlüsselgen“ für die Funktion der *Geosiphon*-Symbiose darstellen. Die Ergebnisse werden im Zusammenhang mit ihrer möglichen Bedeutung für die Aufklärung des Stofftransportes zwischen den Symbiospartnern von *Geosiphon* und für die Weiterentwicklung der Erforschung von *Geosiphon* auf genomischer Ebene diskutiert. Die Kenntnis der cDNA-Sequenz von *Gphxt1* wird wahrscheinlich zur Isolierung von Zuckertransporter-Genen aus anderen AM-Pilzen führen. Mit Hilfe der erstellten Hefeexpressions-cDNA-Bank können in Zukunft weitere Gene aus *Geosiphon pyriformis* isoliert und funktionell charakterisiert werden.

6. Literaturliste

Azcon-Aguilar, C. and Barea, J.M. (1996).

Arbuscular mycorrhizas and biological control of soilborne plant pathogens - an overview of the mechanisms involved.

Mycorrhiza 6, 457-464.

Bago, B., Pfeffer, P.E., Abubaker, J., Jun, J., Allen, J.W., Brouillette, J., Douds, D.D., Lammers, P.J. and Shachar-Hill, Y. (2003).

Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid.

Plant Physiology 131, 1496-1507.

Balestrini, R., Romera, C., Puigdomenech, P. and Bonfante, P. (1994).

Location of a cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein, cellulose and β -1,3-glucans in apical and differentiated regions of maize mycorrhizal roots

Planta 195, 201-20.

Ball C.A., Dolinski K., Dwight S.S., Harris M.A., Issel-Tarver, L., Kasarskis A., Scafe C.R., Sherlock, G., Binkley, G., Jin, H., Kaloper, M., Orr, S.D., Schroeder, M., Weng, S., Zhu, Y., Botstein, D. and Cherry, J.M. (2000).

Integrating functional genomic information into the *Saccharomyces* genome database.

Nucleic Acids Research 28, 77-80.

Blumenthal, J.H. (1976).

Reserve carbohydrates in *fungi*.

In: *The Filamentous Fungi* (Vol 2, Biosynthesis and Metabolism) . J.E. Smith, D.R. Berry (eds), Edward Arnold, London, 292-315.

Boles, E. and Hollenberg, C.P.(1997).

The molecular genetics of hexose transport in yeasts.

FEMS Microbiology Reviews 21, 85-111.

Bonfante-Fasolo, P., Faccio, A., Perotto, S. and Schubert, A. (1990).

Correlation between chitin distribution and cell wall morphology in the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*.

Mycological Research 94, 157-165.

Bonfante, P. and Perotto, S. (1995).

Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants.

New Phytologist 130, 3-21.

Boorer, K.J., Loo, D.D. and Wright, E.M. (1994).

Steady-state and presteady-state kinetics of the H^+ /hexose cotransporter (STP1) from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Xenopus* oocytes

Journal of Biological Chemistry 269, 20417-2042.

Bush, DR. (1993).

Proton-coupled sugar and amino acid transporters in plants.

Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 44, 513-542.

Büttner, M. and Sauer, N. (2000).

Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology.

Biochimica et Biophysica Acta 1465, 263-274.

Couvreur, B., Bollen A., Le Ray, D. and Dujardin, J.C. (2003).

Reverse transcription-polymerase chain reaction construction of plasmid-based, full-length cDNA libraries from *Leishmania infantum* for in vitro expression screening.
Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 98, 477-80.

Dehne, H.W. (1986).

Influence of VA mycorrhizae on hostplant physiology.
In: Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae. V. Gianinazzi-Pearson, S. Gianinazzi (eds). Institut National de la Recherche Agronomique, 431-435.

Delp, G., Smith, S.E. and Barker, S.J. (2000).

Isolation by differential display of three partial cDNAs potentially coding for proteins from the VA mycorrhizal *Glomus intraradices*.
Mycological Research 104:293–300.

Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D. and Siebert, P.D. (1996).

Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93, 6025-6030.

Drummond, D.R., Armstrong, J. and Colman, A. (1985).

The effect of capping and polyadenylation on the stability, movement and translation of synthetic messenger RNAs in *Xenopus* oocytes.
Nucleic Acids Research 13, 7375-94.

Farrar, J.F. and Lewis, D.H. (1987).

Nutrient relations in biotrophic infections.
In: Fungal Infection of Plants. G.F. Pegg, P.G. Ayres (eds). Cambridge University Press, Cambridge, UK, 104-113.

Fuhrmann, G.F., and Völker, B. (1992).

Regulation of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae*.
Journal of Biotechnology 27, 1-15.

Fuhrmann, G.F., and Völker, B. (1993).

Misuse of graphical analysis in nonlinear transport kinetics by Eadie-Hofstee plots.
Biochimica et Biophysica Acta 1145, 180-182.

Gehrig, H. and Schübler, A. and Kluge M. (1996).

Geosiphon pyriforme, a fungus forming endocytobiosis with *Nostoc* (Cyanobacteria), is an ancestral member of the Glomales: evidence by SSU rRNA analysis.
Journal of Molecular Evolution 43, 71-81.

Gianinazzi-Pearson, V., Smith, S.E., Gianinazzi S, Smith, F.A.(1991).

Enzymatic studies on the metabolism of vesicular arbuscular mycorrhizas: V. Is H⁺-ATPase a component of ATP-hydrolyzing enzyme activities in plant-fungus interfaces?
New Phytologist 117, 61–74.

Gianinazzi-Pearson, V., Arnould C., Oufattole, M., Arango, M. and Gianinazzi S. (2000).

Differential activation of H⁺-ATPase genes by an arbuscular mycorrhizal fungus in root cells of transgenic tobacco.
Planta 211, 609-13.

Gillian-Daniel, D.L., Gray, N.K., Astrom, J., Barkoff A. and Wickens, M. (1998).

Modifications of the 5' cap of mRNAs during *Xenopus* oocyte maturation: independence from changes in poly(A) length and impact on translation.
Molecular and Cellular Biology 18, 6152-63.

Goswitz, V.C. and Brooker, R.J. (1995).

Structural features of the uniporter/symporter/antiporter superfamily.
Protein Science 4, 534-7.

Grignon, C. and Sentenac, H. (1991).

pH and ionic conditions in the apoplast.
Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 42, 103–128.

Guttenberger, M.(2000).

Arbuscules of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi inhabit an acidic compartment within plant roots.
Planta 211, 299-304.

Harrier, L.A. (2001)

The arbuscular mycorrhizal symbiosis: a molecular review of the fungal dimension.
Journal of Experimental Botany 52, 469-78.

Harrison, M.J., Dewbre, G.R. and Liu , J. (2002).

A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi.
Plant Cell 14, 2413-29.

Harrison, M.J. and van Buuren, M.L. (1995).

A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*.
Nature 378, 626-629.

Hause, B. and Fester, T. (2005)

Molecular and cell biology of arbuscular mycorrhizal symbiosis.
Planta 221, 184-96.

Hildebrandt, U., Kaldorf, M. and Bothe H. (1999).

The zinc violet and its colonisation by arbuscular mycorrhizal fungi.
Journal of Plant Physiology 154, 709-717.

Hilken, G., Iglauer, F. und Richter, H.P. (1997)

Der Krallenfrosch *Xenopus laevis* als Labortier: Biologie, Zucht und experimentelle Nutzung.
Ferdinand Enke, Stuttgart.

Honegger, R. (1991).

Functional aspects of the Lichen symbiosis.
Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 42, 553-578.

Huang, Y., M. J. Lemieux, J. Song, M. Auer, and D. N. Wang. (2003).

Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*.
Science 301, 616–620.

Hughes MJ, Andrews DW. (1997).

A single nucleotide is a sufficient 5' untranslated region for translation in an eukaryotic *in vitro* system.
FEBS Letters 414, 19-22.

Hurowitz, E.H., Brown, P.O. (2003).

Genome-wide analysis of mRNA lengths in *Saccharomyces cerevisiae*.
Genome Biology 5, R2.

Isaacs S. (1992).

Fungal-plant interactions.
Chapman and Hall, London

Jackson R.M., Mason P.A. (1984).

Mycorrhiza.

Edward Arnold (Publishers) Ltd, London.

Jacquelinet-Jeanmougin, J., Gianinazzi-Pearson, V., and Gianinazzi, S. (1987).Endomycorrhizas in the Gentianaceae. II. Ultrastructural aspects of symbiont relationship in *Gentiana lutea* L.*Symbiosis* 3, 269-286.**Jakobsen, I. (1995).**

Transport of phosphorus and carbon in VA mycorrhizas.

In: Mycorrhiza. A. Varma, B. Hock (eds). Springer-Verlag, Berlin, 297-324.

Johnston M. (1999).

Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells.

Trends in Genetics 15, 29-33.**Jansen, M.L., Daran-Lapujade, P., de Winde, J.H., Piper, M.D. and Pronk, J.T. (2004).**Prolonged maltose-limited cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* selects for cells with improved maltose affinity and hypersensitivity.*Applied and Environmental Microbiology* 70, 1956-63**Kasahara, T. and Kasahara, M. (2003).**Transmembrane segments 1, 5, 7 and 8 are required for high-affinity glucose transport by *Saccharomyces cerevisiae* Hxt2 transporter.*Biochemical Journal* 372, 247-252.**Kluge, M., Mollenhauer, D. and Mollenhauer R. (1991).**Photosynthetic carbon assimilation in *Geosiphon pyriforme* (Kützinger) Fr. v. Wettstein, an endosymbiotic association of fungus and a cyanobacterium.*Planta* 185, 311-315.**Kluge, M., Mollenhauer, D., Wolf, E., Schüßler, A. (2002).**The *Nostoc* - *Geosiphon* endocytobiosis.In: *Cyanobacteria in Symbiosis* (Chapter 3). A.N. Rai, B. Bergman, U. Rasmussen (eds), Kluwer Academic Publishers, 19-30**Knapp, E. (1933).**Über *Geosiphon pyriforme* Fr. v. Wettst., eine intrazelluläre Pilz-Algen-Symbiose*Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 51, 210-217.**Ko, M.S., Kitchen, J.R., Wang, X., Threat, T.A., Wang, X., Hasegawa, A., Sun, T., Grahovac, M.J., Kargul, G.J., Lim, M.K., Cui, Y., Sano, Y., Tanaka, T., Liang, Y., Mason, S., Paonessa, P.D., Sauls, A.D., DePalma, G.E., Sharara, R., Rowe, L.B., Eppig, J., Morrell C. and Doi, H. (2000).**

Large-scale cDNA analysis reveals phased gene expression patterns during preimplantation mouse development

Development 127, 1737-1749.**Kozak, M. (1986).**

Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes.

Cell 44, 283-92.**Krieg, P.A. and Melton, D.A. (1984).**

Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs.

Nucleic Acids Research 12, 7057-70.

Kruckeberg, A.L. (1996).

The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*.
Archives of Microbiology 166, 283-92.

Lagunas, R. (1993).

Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*.
FEMS Microbiol Reviews 104, 229-242.

Lalonde, S., Boles, E., Hellmann, H., Barker, L., Patrick, J.W., Frommer, W.B. and Ward, J.M. (1999).

The dual function of sugar carriers. Transport and sugar sensing.
Plant Cell 11, 707-26.

Lalonde, S, Wipf, D. and Frommer, W.B. (2004).

Transport mechanisms for carbon and nitrogen between source and sink.
Annual Reviews of Plant Biology 55, 341-371.

Liman, E.R., Tytgat, J. and Hess, P. (1992).

Subunit stoichiometry of a mammalian K1 channel determined by construction of multimeric cDNAs.
Neuron 9, 861-871.

Lodish, H.F. (1988).

Multi-spanning membrane proteins: how accurate are the models?
Trends in Biochemical Sciences 13, 332-4.

Marger M. D., Saier MH Jr. (1993).

A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport.
Trends in Biochemical Sciences 18, 13-20.

Maiden, M.C.J., Davis, E.O., Baldwin, S.A., Moore, D.C.M. and Henderson, P.J.F., (1987).

Mammalian and bacterial sugar transport proteins are homologous.
Nature 325, 641-643.

Madi, L., McBride, S.A., Bailey, L.A. and Ebbole, D.J. (1997).

rco-3, a gene involved in glucose transport and conidiation in *Neurospora crassa*.
Genetics 146, 499-508.

Miller, A.J., Smith, S.J. and Theodolou, F.L. (1994)

The heterologous expression of H⁺-coupled transporters in *Xenopus* oocytes.
In: Membrane transport in plants and fungi: Molecular mechanisms and control. M.R. Blatt, R.A. Leigh and D. Sanders. Company of Biologists Ltd, Cambridge, 167-178.

Miller, A.J. and Zhou, J.J. (2000).

Xenopus oocytes as an expression system for plant transporters.
Biochimica et Biophysica Acta 1465, 343-358.

Meeks, J.C, Elhai, J., Thiel, T., Potts, M., Larimer, F., Lamerdin, J., Predki, P. and Atlas, R. (2001).

An overview of the genome of *Nostoc punctiforme*, a multicellular, symbiotic cyanobacterium.
Photosynthesis Research 70 85-106.

Maldonado-Mendoza, I.E., Dewbre, G.R. and Harrison, M.J. (2001).

A phosphatetransporter gene from the extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment.
Molecular Plant Microbe Interactions 14, 1140-1148.

Medintz, I., Jiang, H., Han, E.K., Cui W. and Michels, C.A. (1996).

Characterization of the glucose-induced inactivation of maltose permease in *Saccharomyces cerevisiae*.

Journal of Bacteriology 78, 2245-54.

Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S. and Pesole, G. (2002).

Untranslated regions of mRNAs.

Genome Biology 3, 0004.1-0004.10.

Mitchell, P. (1961).

Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transport by a chemi-osmotic type of mechanism.

Nature 191, 144-148.

Mitchell, P. (1963).

Molecule, group and electron translocation through natural membranes.

Biochemical Society Symposium 22, 142-168.

Mullis, K. B., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Ehrlich, H. (1986).

Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction.

Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology 51, 263-273.

Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1987).

Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.

Methods in Enzymology 155, 336.

Nehls, U., Wiese, J., Guttenberger, M. and Hampp, R.(1998).

Carbon allocation in ectomycorrhizas: identification and expression analysis of an *Amanita muscaria* monosaccharide transporter.

Molecular Plant Microbe Interactions 11, 167-76.

Nett, J.H, Kessl J, Wenz T. and Trumpower B.L.(2001).

The AUG start codon of the *Saccharomyces cerevisiae* NFS1 gene can be substituted for by UUG without increased initiation of translation at downstream codons.

European Journal of Biochemistry 268, 5209-14

Nobuaki, M., Wimmers, L.E. and Bennett, A.B. (1996).

Sugar regulates mRNA abundance of H⁺-ATPase gene family members in tomato.

Plant Physiology 112, 1229-1236.

Ouziad, F., Hildebrandt U., Schmelzer, E. and Bothe, H. (2005).

Differential gene expressions in arbuscular mycorrhizal-colonized tomato grown under heavy metal stress.

Journal of Plant Physiology 162, 634-49.

Özcan, S. and Johnston, M. (1999)

Function and regulation of yeast hexose transporters.

Microbiol and Molecular Biology Reviews 63, 554-69.

Tamasloukht, MB., Séjalon-Delmas, N., Kluever, A., Jauneau, A., Roux, C., Bécard, G. and Franken, P. (2003).

Root factors induce mitochondrial-related gene expression and fungal respiration during the developmental switch from asymbiosis to presymbiosis in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*.

Plant Physiology 131, 1–11.

Tanner, W. and Caspari T. (1996).

Membrane Transport Carriers

Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 47, 595-626.

Taylor, T.N., Remy, W., Hass, H. and Kerp, H. (1995).

Fossil arbuscular mycorrhizae from the Early Devonian.

Mycologia 87, 560–573.

Touriol, C., Bornes, S., Bonnal, S., Audigier, S., Prats, H., Prats, A.C. and Vagner, S. (2003).

Generation of protein isoform diversity by alternative initiation of translation at non-AUG codons.

Biology of the Cell 95, 169-178.

Tran, D.P., Kim, S.J., Park N.J., Jew T.M. and Martinson, H.G. (2001).

Mechanism of poly(A) signal transduction to RNA polymerase II *in vitro*.

Molecular and Cellular Biology 21, 7495-508.

Trappe, J.M. (1987).

Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in the angio-sperms from an evolutionary standpoint.

In: Ecophysiology of VA Mycorrhizal Plants. (Safir G.R., ed). CRC Press, Boca Raton, Florida, 5-25.

Rai, A.N. and Bergman, B. 2002.

Cyanolichens.

In: Commentaries on Cyanobacterial Symbioses (102B). (B. Osborne ed). Royal Irish Academy, Dublin, 19-22.

Rausch, C., Daram, P., Brunner, S., Jansa, J., Laloi, M., Leggewie, G., Amrhein, N. and Bucher, M. A. (2001)

A phosphate transporter is expressed in arbuscule-containing cells in potato.

Nature 414, 462-470.

Redecker, D., Kodner R., Graham, L.E. (2000).

Glomalean fungi from the Ordovician.

Science 289, 1920-1921.

Reifenberger E, Boles E, Ciriacy M. (1997).

Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression.

European Journal of Biochemistry 245, 324-333.

Requena, N., Breuninger M., Franken, P. and Ocon, A. (2003).

Symbiotic status, phosphate and sucrose regulate the expression of two plasma membrane H⁺-ATPase genes from the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*

Plant Physiology 132, 1540-1549.

Requena, N. and Breuninger, M. (2004).

The old arbuscular mycorrhizal symbiosis in the light of the molecular era.

In: Progress in Botany (65). K. Esser, U. Lüttge, W. Beyschlag, J. Murata (eds). Springer Verlag Berlin Heidelberg, 323-356.

Rolland, F., Moore, B., Sheen, J. (2002).

Sugar Sensing and Signaling in Plants.

Plant Cell 14, 185-205.

Pao S.S., Paulsen I.T. and Saier M.H.Jr. (1998).

Major facilitator superfamily.

Microbiology and Molecular Biology Reviews 62, 1-34.

Paszkowski, U., Kroken, S., Roux, C. and Briggs, S.P. (2002).

Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99, 13324-13329.

Peabody, D.S. (1989).

Translation initiation at non-AUG triplets in mammalian cells.

Journal of Biological Chemistry 264, 5031-5035

Perotto, S., Brewin, N.J., and Bonfante, P. (1994).

Colonization of pea roots by the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* and by *Rhizobium* bacteria: immunological comparison using monoclonal antibodies as probes for plant surface components.

Molecular Plant-Microbe Interactions 7, 91-98.

Peterson, R. L., Howath, M.J. and Whittier, D.P. (1981).

Interactions between a fungal endophyte and gametophyte cells in *Psilotum nodum*.

Canadian Journal of Botany 59, 711-720.

Pfeffer, P.E., Shachar-Hill, Y., Douds, D. and Bécard, G. (1996).

Metabolism of glucose, its uptake and translocation in mycorrhizal leek and transformed carrot roots.

In: Proceedings of the First International Conference on Mycorrhizae, August 4–9, 1996, Berkeley, California.

Pfeffer P.E., Douds D.D., Bécard G. and Shachar-Hill, Y. (1999).

Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in and arbuscular mycorrhiza.

Plant Physiology 120, 587–598

Pfeffer, P.E., Bago, B. and Shachar-Hill, Y. (2001).

Exploring mycorrhizal function with NMR spectroscopy

New Phytologist 150, 543-553.

Piao, Y., Ko, N.T., Lim, M.K. and Ko, M.S. (2001).

Construction of long-transcript enriched cDNA libraries from submicrogram amounts of total RNAs by a universal PCR amplification method.

Genome Research 11, 1553-8.

Saito, M. (1995).

Enzyme activities of the internal hyphae and germinated spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall.

New Phytologist 129, 425-431.

Sanders, F.E., Tinker, P.B., Black, R.L.B. and Palmerley, S.M. (1977).

The development of endomycorrhizal rootsystems. Spread of infection and growth-promoting effects with four species of vesicular-arbuscular endophyte.

New Phytologist 78, 257-268.

Sauer, N., Tanner, W. (1989).

The hexose carrier from *Chlorella*. cDNA cloning of a eukaryotic H⁺-cotransporter.

FEBS Letters 259, 43-46.

Schmid, E. und Oberwinkler, F. (1993).

Mycorrhiza-like interaction between the achloro-phyllous gametophyte of *Lycopodium clavatum* L. and its fungal endophyte studied by light and electron microscopy.

New Phytologist 124, 69-81.

Schüßler, A., Mollenhauer, D., Schnepf, E. und Kluge, M. (1994).

Geosiphon pyriforme, an endosymbiotic association of fungus and cyanobacteria: the spore structure resembles that of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi.
Botanica Acta 107, 36-45.

Schüßler, A., Schnepf E., Mollenhauer D. und Kluge, M. (1995).

The fungal bladders of the endocyanosis *Geosiphon pyriforme*, a Glomus-related fungus: cell wall permeability indicates a limiting pore radius of only 0.5 nm.
Protoplasma 185, 131-139.

Schüßler A., Bonfante P., Schnepf E., Mollenhauer D. and Kluge, M. (1996)

Characterization of the *Geosiphon pyriforme* symbiosome by affinity techniques: confocal laser scanning microscopy (CLSM) and electron microscopy.
Protoplasma 190: 53-67.

Schüßler, A., Schwarzott, D. and Walker, C. (2001).

A new fungal Phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution.
Mycological Research 105, 1413-1421.

Schüßler A. and Kluge, M. (2001).

Geosiphon pyriforme, an endo-cytosymbiosis between fungus and cyanobacteria, and its meaning as a model system for arbuscular mycorrhizal research.
In: The Mycota IX-Fungal Associations. B. Hock (ed.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 151-161.

Schüßler, A. (2002).

Molecular phylogeny, taxonomy, and evolution of *Geosiphon pyriformis* and arbuscular mycorrhizal fungi.
Plant and Soil 244: 75-83.

Schüßler, A. (2005).

Das fünfte Pilz-Phylum: die Glomeromycota.
BIOspektrum 6/04, 741-742

Schüßler, A. and Wolf, E. (2005).

Geosiphon pyriformis - a glomeromycotan soil fungus forming endosymbiosis with cyanobacteria.
In: In vitro culture of mycorrhizas (Soil Biology, Volume 4). S. Declerck, D-G. Strullu, J.A. Fortin (eds), Springer Verlag Berlin Heidelberg, 271-289.

Schwab, S.M., Menge, J.A. and Tinker, P.B. (1991).

Regulation of nutrient exchange between host and fungus in VA mycorrhizae.
New Phytologist 117, 387-398.

Shachar-Hill, Y., Pfeffer, P.E., Douds, D., Osman, S.F., Doner, L.W. and Ratcliffe, R.G. (1995).

Partitioning of intermediate carbon metabolism in VAM colonized leek.
Plant Physiology 108, 7-15.

Smith, S.E., Dickson, S., Morris, C. and Smith, F.A. (1994).

Transport of phosphate from fungus to plant in VA mycorrhizas: Calculation of the area of symbiotic interface and of fluxes of P from two different fungi to *Allium porrum* L.
New Phytologist 127, 93-99.

Smith S.E., Read, D.J. (1997).

Mycorrhizal Symbiosis.
2nd edition. Academic Press, London.

Smith, E., Dickson, S. and Smith, F.A. (2001).

Nutrient transfer in arbuscular mycorrhizas: how are fungal and plant processes integrated?
Australian Journal of Plant Physiology 28, 638-694.

Snellgrove, R.C., Stribley, D.P. and Hepper, C.M. (1987).

Host endophyte relationships: invertase in roots.
Rothamsted Experimental Station Reports 1986, 142

Solaiman, M.D. and Saito, M. (1997).

Use of sugars by intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by radiorespirometry.
New Phytologist 136, 533–538.

Taylor, T.N., Remy, W., Hass H., Kerp, H. (1995).

Fossil arbuscular mycorrhizae from the Early Devonian.
Mycologia 87, 560–573.

Voegelé, R.T., Struck C, Hahn M. and Mendgen K. (2001).

The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98, 8133-8138.

van Kuyk, P.A., Jasper, A., Maccabe, A.P., Hererro, O., Ruijter, G.J.G. and Visser, J. (2004).

Aspergillus niger *mstA* encodes a high-affinity sugar/H⁺ symporter which is regulated in response to extracellular pH.
Biochemical Journal 379, 375–383.

von Wettstein, F. (1915).

Geosiphon Fr. Wettst., eine neue, interessante Siphonacee.
Österreichische Botanische Zeitschrift 5/6, 145-155.

Walmsley, A.R., Barrett, M.P., Bringaud F., Gould, G.W. (1998).

Sugar transporters from *bacteria*, parasites and mammals: structure-activity relationships.
Trends in Biochemical Sciences 23, 476-481.

Walsh, M.C., Smits, H.P., Scholte M., Smits G. and van Dam, K. (1994).

Rapid kinetics of glucose uptake in *Saccharomyces cerevisiae*.
Folia Microbiologica 39, 557-559.

Watari, J., Kobae, Y., Yamaki, S., Yamada, K., Toyofuku, K., Tabuchi, T., Shiratake, K. (2004)

Identification of sorbitol transporters expressed in the phloem of apple source leaves.
Plant and Cell Physiology 45, 1032-41.

Wipf, D., Benjdia, M., Rikirsch, E., Zimmermann, S., Tegeder M. and Frommer, W.B. (2003).

An expression cDNA library for suppression cloning in yeast mutants, complementation of a yeast *his4* mutant, and EST analysis from the symbiotic basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum*.
Genome 46, 177-81.

Wieczorke, R., Krampe, S., Weierstall, T., Freidel, K., Hollenberg, C.P. and Boles, E. (1999).

Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*.
FEBS Letters 464, 23-8.

Wiese J., Kleber, R., Hampp, R., and Nehls, U. (2000).

Functional characterization of the *Amanita muscaria* monosaccharide transporter, AmMst1. *Plant Biology* 2, 278-282.

Woolhouse, H. (1975).

Membrane structure and transport problems considered in relation to phosphorus and carbohydrate movements and the regulation of endotrophic mycorrhizal associations. *In: Endomycorrhizas, Proceedings of a Symposium held at the University of Leeds, 22–25 July 1974*, F.E. Sanders, B. Mosse, P.B. Tinker (eds). Academic Press, London, 209–239.

Wright, S.F., Upadhyaya, A. and Buyer, J.S. (1998).

Comparison of N-linked oligo-saccharides of glomalin from arbuscular mycorrhizal fungi and soils by capillary electro-phoresis. *Soil Biol. Biochemistry* 30, 1853-1857.

Wright, S.F., and Upadhyaya, A. (1996).

Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science* 161, 575–586.

Xiong, W., Hsieh, C.C., Kurtz, A.J., Rabek, J.P., and Papaconstantinou, J. (2001).

Regulation of CCAAT/enhancer-binding protein-beta isoform synthesis by alternative translational initiation at multiple AUG start sites. *Nucleic Acids Res* 29, 3087-3098.

Zhou, J.J., Theodolu, F.L., Muldin, I., Ingemarsson, B. and Miller, A.J. (1998).

Cloning and functional characterisation of a *Brassica napus* transporter that is able to transport nitrate and histidine. *Journal of Biological Chemistry* 273: 12017-12023.

Zhou, J.J., Trueman, L.J., Boorer, K.J., Theodolou, F.L., Fordes, B.G. and Miller, A.J. (2000).

A high affinity fungal nitrate transporter with two transport mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* 275, 39894-39899.

Anhang

Annotation der in dieser Arbeit isolierten cDNA-Sequenzen

I.

Annotation cDNA-Sequenzen *hm15-18*

(durchsequenziert)

Klon	Länge (bp)	Startcodon/ ORF-Länge (AS)	Homologie	Organismus/ Accession	Identität (AS)	Ähnlichkeit (AS)	konservierte Bereiche	Bemerkungen
HM 15-N5	376	ATG / 21 (213 bp - 260 bp)	hypothetical protein WU BLASTX	<i>Xylella fastidiosa</i> Q9PH93	26 / 46 (56%)	32 / 46 (69%)	-	ähnlich zu: pHM18-K4
HM 15-R1	566	- / 105 (3 bp - 320 bp)	deetiolated, light-mediated development protein NCBI BLASTP	<i>Arabidopsis thaliana</i> DET1 ARATH	53 / 105 (50%)	68 / 105 (64%)	-	-
HM 15-S1	542	ATG / (22)* (1 bp - 69 bp)	NADH-dehydro- genase, subunit 5 NCBI BLASTX	<i>Paramartyria immaculatella</i> BAC87827	23 / 83 (27%)	43 / 83 (51%)	-	-
HM 15-S3	1012	ATG / 272 (19 bp - 837 bp)	hypothetical protein WU BLASTX	<i>Ustilago maydis</i> Q4P3W1	79 / 281 (28%)	121 / 281 (43%)	-	8 Trans- membran Helices
			AmpG, murein peptide permease WU BLASTX	<i>Rickettsia typhi</i> Q68WQ5 RICTY	58 / 252 (23%)	111 / 252 (44%)		
HM 16-A3	705	ATG / 149 (3 bp - 452 bp)	S1, 40S ribosomal protein NCBI BLASTP	<i>Bos taurus</i> XM_591980.1	89 / 134 (66%)	108 / 134 (80%)	ribosomal, S17	ähnlich zu: pHM18-M4
HM 16-A4	585	TTG / (34)* (14 bp - 118 bp)	NADH dehydrogenase NCBI BLASTX	<i>Polycarena formosa</i> CAB99439	17 / 41 (41%)	24 / 41 (58%)	-	-
HM 16-F2	925	ATG / 207 (1 bp - 624 bp)	CG14622-PB, isoform B, rearrangement of cytoskeleton related NCBI BLASTP	<i>Drosophila melanogaster</i> NP_726724.	53/165 (32%)	80 / 165 (48%)	formin homology 2 domain	wie pHM16-F4, 67 bp kürzer

* Wenn das BLASTX-Ergebnis auf mehr als der angegebenen ORF-Länge Ähnlichkeiten lieferte, so muss von einem unterbrochenen ORF ausgegangen werden. Die ORF-Länge ist dann in Klammern angegeben.

Klon	Länge (bp)	Startcodon/ ORF-Länge (AS)	Homologie	Organismus/ Accession	Identität (AS)	Ähnlichkeit (AS)	konservierte Bereiche	Bemerkungen
HM 16-F4	995	ATG / 207 (1 bp - 624 bp)	CG14622-PB, isoform B, rearrangement of cytoskeleton related NCBI BLASTP	<i>Drosophila melanogaster</i> NP_726724	53 / 165 (32%)	80 / 165 (48%)	formin homology 2 domain	-
HM 17-R3	348	- / 59 (3 bp - 182 bp)	hexose transporter WU BLASTX	<i>Prunus persica</i> Q946W9 PRUPE	10 / 22 (45%)	15 / 22 (68%)	-	-
			triose or hexose phosphate/phosphate translocator, putative WU BLASTP	<i>Plasmodium chabaudi</i> Q4Y1U3 PLACH	12 / 29 (41%)	21 / 29 (72%)		
HM 17-S3	454	- / 92 (2 bp - 286 bp)	ATP F0 synthase, subunit 6 WU BLASTX	<i>Melipona bicolor</i> Q85TI0	33 / 89 (37%)	51 / 89 (57%)	-	3 Transmembran Helices
HM 17-S4	617	ATG / 140 (30 bp - 452 bp)	L23, ribosomal protein NCBI BLASTP	<i>Pan troglodytes</i> XM_511444.1	121 / 139 (87%)	133 / 139 (95%)	ribosomal, L14	-
HM18-J4	708	ATG / (50)* (253 - 405)	L1-B, 60S ribosomal protein WU BLASTX	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> R10B SCHPO	144 / 195 (73%)	169 / 195 (86%)	-	ähnlich zu: pHM18-P2
HM 18-J5	447	TTG / (34)* (40 bp - 144 bp)	SecY-independent transporter protein NCBI BLASTX	<i>Thraustochytrium aureum</i> AAG23671	24 / 77 (31%)	37 / 77 (48%)		Sequenz enthält kein ATG, ähnlich zu pHM27-F2
HM 18-K2	553	ATG / 118 (55 bp - 411 bp)	vacuolar ATP synthase, subunit F WU BLASTX	<i>Neurospora crassa</i> VATF NEUCR	82 / 115 (71%)	94 / 115 (81%)	ATP synthase, subunit F	-

* Wenn das BLASTX-Ergebnis auf mehr als der angegebenen ORF-Länge Ähnlichkeiten lieferte, so muss von einem unterbrochenen ORF ausgegangen werden. Die ORF-Länge ist dann in Klammern angegeben.

Klon	Länge (bp)	Startcodon/ ORF-Länge (AS)	Homologie	Organismus/ Accession	Identität (AS)	Ähnlichkeit (AS)	konservierte Bereiche	Bemerkungen
HM 18-K4	409	ATG / (22)* (41 bp - 109 bp)	Xf0051, hypothetical protein WU BLASTX	<i>Xylella fastidiosa</i> Q9PH93	28 / 55 (50%)	41 / 55 (74%)	-	ähnlich zu: pHM15-N5
HM 18-L4	928	ATG / 158 (119 bp - 595 bp)	putative dihydro-lipoamide S-acetyl transferase NCBI BLASTP	<i>Oryza sativa</i> AP003620.3	23 / 70 (32%)	35 / 70 (50%)	-	1 Trans-membran Helix
HM 18-M4	718	ATG / 149 (3 bp - 452 bp)	S17, 40S ribosomal protein NCBI BLASTP	<i>Bos taurus</i> XM_591980.1	90 / 134 (67%)	109 / 134 (81%)	ribosomal, S17e	ähnlich zu: pHM16-A3
HM 18-N2	643	ATG / 63 (345 bp - 536 bp)	potential resistance protein, involved in apoptosis WU BLASTP	<i>Rosa roxburghii</i> Q6J6Z0_9ROSA	19 / 53 (35%)	28 / 53 (52%)	-	-
HM 18-N5	296	ATG / (28)* (73 bp - 159 bp)	Xf0051, hypothetical protein WU BLASTX	<i>Xylella fastidiosa</i> Q9PH93	26 / 46 (56%)	32 / 46 (69%)	-	ähnlich zu: pHM15-N5 und pHM18-K4
HM 18-P2	929	ATG / 216 (55 bp - 705 bp)	L1-B, 60S ribosomal protein NCBI BLASTP	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> R10B_SCHPO	158 / 216 (73%)	184 / 216 (85%)	ribosomal, L1	ähnlich zu: pHM18-J4
HM 18-P4	516	ATG / 88 (89 bp - 355 bp)	cysteine-rich protein NCBI BLASTX	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> S90874.	30 / 78 (38%)	40/78 (51%)	-	2 Trans-membran Helices
HM 18-Q5	443	ATG / (37) (141 bp - 254 bp)	knotted class I homeodomain, related to signal transduction, transcription factor NCBI BLASTX	<i>Medicago truncatula</i> AAG27464	23 / 78 (29%)	38 / 78 (48%)	-	1 Trans-membran Helix

* Wenn das BLASTX-Ergebnis auf mehr als der angegebenen ORF-Länge Ähnlichkeiten lieferte, so muss von einem unterbrochenen ORF ausgegangen werden. Die ORF-Länge ist dann in Klammern angegeben.

II.

Annotation cDNA-Sequenzen *hm39*

(durchsequenziert)

Klon	Länge (bp)	Startcodon/ ORF-Länge (AS)	Ähnlichstes Protein	Organismus/ Accession	Identität (AS)	Ähnlichkeit (AS)	konservierte Bereiche	Bemerkungen
HM39-A5	872	ATG / 226 (99 bp - 779 bp)	putative triacylglycerol lipase NCBI BLASTP	<i>Oryza sativa</i> XM_479442.1	50 / 178 (28%)	80 / 178 (44%)	lipase, class 3	ähnlich zu: pHM39-H, 1 Trans-membran Helix
HM39-A6	862	CTG / 113 (29 bp - 370 bp)	hit-like protein (nucleotidyl hydrolases) WU BLASTX	<i>Aeropyrum pernix</i> Q9YFX8	23 / 74 (31%)	42 / 74 (56%)	-	2 Trans-membran Helices
HM39-A8	1195	TTG / 217 (74 bp - 727 bp)	serine/threonine protein phosphatase PP1 WU BLASTX	<i>Emericella nidulans</i> PP1_EMENI	153 / 168 (91%)	163 / 168 (97%)	protein-phosphatase 2A	-
HM39-A12	1021	TTG / 272 (112 bp - 930 bp)	C23B6.04c, contains 1 CRAL-TRIO domain, related to lipid binding NCBI BLASTP	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> Q9UU99	104 / 226 (46%)	147/226 (65%)	Sec14p-like lipid-binding domain, CRAL / TRIO domain	-
HM 39-B2	885	TTG / (50)* (164 bp - 316 bp)	NADH dehydrogenase subunit 4 NCBI BLASTX	<i>Melipona bicolor</i> NC_004529.1	20 / 70 (28%)	31 / 70 (44%)	-	1 Trans-membran Helix
HM 39-B9	1262	ATG / (24)* (284 bp - 358 bp)	hypothetical protein NCBI BLASTX	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> AL590606.1	41 / 171 (23%)	58 / 171 (33%)	-	ähnlich zu: pHM39-D9
HM 39-C3	1245	ATG / (26)* (838 bp - 918 bp)	cytochrome P450 monooxygenase WU BLASTX	<i>Zea mays</i> O64410	24 / 28 (85%)	25 / 28 (89%)	-	-
HM 39-C7	206	ATG / (21)* (54 bp - 119 bp)	putative heat-shock protein WU BLASTX	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YNU7_YEAST	19 / 56 (33%)	30 / 56 (53%)	-	-
HM 39-D2	1477	ATG / (418)* (55 bp - 1311)	fumarylacetoacetase WU BLASTX	<i>Rattus norvegicus</i> FAAA_RAT	253/420 (60%)	319 / 420 (75%)	fumaryl-acetoacetate hydrolases	-

* Wenn das BLASTX-Ergebnis auf mehr als der angegebenen ORF-Länge Ähnlichkeiten lieferte, so muss von einem unterbrochenen ORF ausgegangen werden. Die ORF-Länge ist dann in Klammern angegeben.

Klon	Länge (bp)	Startcodon/ ORF-Länge (AS)	Ähnlichstes Protein	Organismus/ Accession	Identität (AS)	Ähnlichkeit (AS)	konservierte Bereiche	Bemerkungen
HM 39-D6	1161	ATG / 230 (115 bp - 807 bp)	probable galactosyl-transferase NCBI BLASTP	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> T38998	50/186 (26%)	83 / 186 (44%)	galactosyl transferases	1 Trans-membran Helix
HM 39-D9	1262	ATG / (24)* (284 bp - 358 bp)	hypothetical protein NCBI BLASTX	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> AL590606.1	41/171 (23%)	58 / 171 (33%)	-	ähnlich zu: pHM39-B9
HM 39-D11	861	ATG / 99 (242 bp - 541 bp)	ABC transporter channel subunit NCBI BLASTX	<i>Malawimonas jakobiformis</i> NC_002553.1	18/60 (30%)	36 / 60 (60%)	-	1 Trans-membran Helix
HM39-E5	1155	ATG / 199 (67 bp - 666 bp)	putative zinc finger protein NCBI BLASTP	<i>Emericella nidulans</i> AF083468.1	56/74 (75%)	64 / 74 (86%)	zinc finger proteins	1 Trans-membran Helix
HM39-E7	1471	ATG / 235 (125 bp - 832 bp)	rad50, ATPase, involved in DNA double-strand break repair WU BLASTX	<i>Methanococcus jannaschii</i> RA50_METJA	27/82 (32%)	47 / 82 (57%)	-	1 Trans-membran Helix
HM39-E11	998	ATG / 160 (250 bp - 732 bp)	transcription activator WU BLASTX	<i>Arabidopsis thaliana</i> Q8L8A6	23/67 (34%)	37 / 67 (55%)	-	-
HM39-E12	892	ATG / 160 (64 bp - 546 bp)	mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM17 WU BLASTX	<i>Neurospora crassa</i> IM17_NEUCR	92/151 (60%)	113 / 151 (74%)	TIM23 family, translocation channels, mitochondrial inner membrane	4 Trans-membran Helices
HM39-F5	758	ATG / (132)* (71 bp - 469 bp)	AMP deaminase WU BLASTX	<i>Dictyostelium discoideum</i> Q9NGX0	42 / 139 (30%)	63 / 139 (45%)	-	1 Trans-membran Helix
HM39-F6	789	TTG / 60 (207 bp - 389 bp)	hypothetical protein WU BLASTX	<i>Agrocybe aegerita</i> O78941	18 / 49 (36%)	28 / 49 (57%)	-	-

* Wenn das BLASTX-Ergebnis auf mehr als der angegebenen ORF-Länge Ähnlichkeiten lieferte, so muss von einem unterbrochenen ORF ausgegangen werden. Die ORF-Länge ist dann in Klammern angegeben.

Klon	Länge (bp)	Startcodon/ ORF-Länge (AS)	Ähnlichstes Protein	Organismus/ Accession	Identität (AS)	Ähnlichkeit (AS)	konservierte Bereiche	Bemerkungen
HM39-G1	1165	ATG / (230)* (178 bp - 870 bp)	rhizopuspepsin precursor WU BLASTX	<i>Rhizopus chinensis</i> CARP_RHICH	78 / 277 (28%)	145 / 277 (52%)	eukaryotic aspartyl proteases	-
HM39-G6	1030	TTG / 30 (732 bp - 834 bp)	DNA polymerase beta WU BLASTX	<i>Platichthys flesus</i> Q98TN4	19 / 51 (37%)	29 / 51 (56%)	-	-
HM39-G8	1033	ATG / 181 (124 bp - 669 bp)	ADP-ribosylation factor NCBI BLASTP	<i>Ustilago maydis</i>	172 / 180 (95%)	177 / 180 (98%)	Rab subfamily of small GTPases / Arf, ADP-ribosylation factor family	-
HM39-H4	872	ATG / 226 (99 bp - 779 bp)	putative triacylglycerol lipase NCBI BLASTP	<i>Oryza sativa</i> XM_479442.1	50 / 178 (28%)	80 / 178 (44%)	lipase, class 3	ähnlich zu: pHM39-A5, 1 Trans-membran Helix
HM39-H7	878	ATG / 224 (78 bp - 752 bp)	putative carbonic anhydrase NCBI BLASTP	<i>Erwinia carotovora</i> CAG76225.	88 / 190 (46%)	143 / 190 (75%)	carbonic anhydrases	-
HM39-H8	912	ATG / 144 (391 bp - 825 bp)	thermoresistant gluconokinase family protein NCBI BLASTP	<i>Aspergillus fumigatus</i> EAL87767	48 / 107 (44%)	68 / 107 (63%)	gluconate kinases	-

* Wenn das BLASTX-Ergebnis auf mehr als der angegebenen ORF-Länge Ähnlichkeiten lieferte, so muss von einem unterbrochenen ORF ausgegangen werden. Die ORF-Länge ist dann in Klammern angegeben.

III.

Annotation cDNA-Sequenzen *hm81*

(5'-teilsequenziert)

Klon	sequenzierte Länge/gesamte Länge(bp)	Startcodon/ ORF-Länge (AS)	Ähnlichstes Protein	Organismus/ Accession	Identität	Ähnlichkeit	konservierte Bereiche	Bemerkungen
HM81-7	638 / 1100	- / 212 (3 bp - 638 bp)	malate dehydrogenase mitochondrial precursor WU BLASTX	<i>Homo sapiens</i> MDHM_HUMAN	121 / 185 (65%)	145 / 185 (78%)	malate dehydro- genases/ L-lactate dehydrogenases	ORF ohne Startcodon
HM81-8	706 / 1200	ATG / 150 (257 bp - 706 bp)	glyoxylate pathway regulator NCBI BLASTP	<i>Yarrowia lipolytica</i> X74146.3	60/127 (47%)	84/127 (66%)	glyoxylate pathway regulators/ predicted membrane proteins	4 Trans- membran Helices, ORF ohne Stopcodon
HM81-17	460 / 1300	ATG / 119 (91 bp - 450 bp)	putative polyubiquitin WU BLASTX	<i>Neurospora crassa</i> Q7RVR9_NEUCR	102 / 105 (97%)	102 / 105 (97%)	ubiquitin homologs	-
HM81-21	618 / 1400	ATG / 75 (93 bp - 230 bp)	hypothetical 26.0 kDa protein WU BLASTX	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> P53930	42/71 (59%)	51 / 71 (71%)	transcription stimulatory activity/ transcription initiation factors	-

IV.

cDNA-Sequenzen *hm82*

(5'-teilsequenziert)

Klon	sequenzierte Länge/gesamte Länge(bp)	Startcodon/ ORF-Länge (AS)	Ähnlichstes Protein	Organismus/ Accession	Identität (AS)	Ähnlichkeit (AS)	konservierte Bereiche	Bemerkungen
HM82-1	211 / 1900	- / (28)* (2 bp - 88 bp)	Myf-5, transcription regulator WU-BLASTX	<i>Cyprinus carpio</i> O93493_CYPCA	14 / 45 (31%)	18 / 45 (40%)	-	ORF ohne Startcodon
HM82-3	759 / 1400	ATG / 224 (88 bp - 759 bp)	hypothetical protein NCBI BLASTP	<i>Cryptococcus neoformans</i> AAEY01000032.1	37 / 164 (22%)	65 / 164 (39%)	-	ORF ohne Stopcodon
HM82-4	421 / 1900	ATG / 95 (129 bp - 416 bp)	nacrein (high homology to carbonic anhydrase) WU-BLASTX	<i>Turbo marmoratus</i> Q8N0R6_9VEST	41 / 66 (62%)	45 / 66 (68%)	-	ähnlich zu: pHMY10-5B22, 1 Transmembran Helix
HM82-9	662 / 2000	ATG / 165 (167 bp - 661 bp)	putative alpha-tubulin NCBI BLASTP	<i>Oikopleura dioica</i> AF465692.1	153 / 165 (92%)	160 / 65 (96%)	tubulin superfamily	1 Transmembran Helix
HM82-14	376 / 1700	ATG / (76)* (128 bp - 358 bp)	related to lustrin A, group of biomineralization proteins WU-BLASTX	<i>Neurospora crassa</i> Q9P6C4_NEUCR	30 / 88 (34%)	46 / 88 (52%)	-	1 Transmembran Helix
HM82-20	805 / 1100	ATG / 109 (204 bp - 533 bp)	hypothetical protein NCBI BLASTP	<i>Neurospora crassa</i> AL669998.1	25 / 63 (39%)	39 / 63 (61%)	-	-

* Wenn das BLASTX-Ergebnis auf mehr als der angegebenen ORF-Länge Ähnlichkeiten lieferte, so muss von einem unterbrochenen ORF ausgegangen werden. Die ORF-Länge ist dann in Klammern angegeben.

8. Publikationen, Vorträge und Posterpräsentationen

Publikationen

Struck, C., Mueller, E., Martin H. and Lohaus, G. (2004).

The *Uromyces fabae* *UfAAT3* gene encodes a general amino acid permease that prefers uptake of *in planta* scarce amino acids

Molecular Plant Pathology 5, 183-189.

Autoren alphabetisch: Cohen, D., Fitz, M., Martin, H., Schübler, A. and Wipf, D.

Arbuscular mycorrhiza - the first glomeromycotan sugar transporter is isolated and characterized

In Vorbereitung, zur Einreichung bei Nature.

Vorträge und Posterpräsentationen

- | | |
|----------------|--|
| September 2002 | Summer School des Graduiertenkollegs 340, Riezlern.
<u>Vortrag:</u>
<i>Geosiphon pyriformis</i> - identification of differentially expressed fungal genes |
| August 2003 | The fourth International conference on mycorrhizae (ICOM4),
Montréal, Canada.
<u>Vortrag:</u>
Identification of symbiosis-specific 'AM-fungal' genes with <i>Geosiphon pyriformis</i> . |
| August 2003 | The fourth International Symbiosis Society Congress, Halifax, Nova
Scotia, Canada.
<u>Posterpräsentation:</u>
<i>Geosiphon pyriformis</i> - differentially expressed genes. |
| September 2003 | Summer School des Graduiertenkollegs 340, Riezlern.
<u>Vortrag:</u>
Identification of symbiosis-specific 'AM-fungal' genes with <i>Geosiphon pyriformis</i> . |
| September 2004 | Summer School des Graduiertenkollegs 340, Hirschegg.
<u>Vortrag:</u>
Identification of symbiosis-specific 'AM-fungal' genes with <i>Geosiphon pyriformis</i> . |

9. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Holger Martin
Geburtsdatum: 24.04.1969
Geburtsort: Konstanz
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung:

1975-1979 Grundschule, Wallgutschule Konstanz
1979-1980 Hauptschule, Stefansschule Konstanz
1980-1981 Gymnasium, Geschwister Scholl-Schule, Konstanz
1981-1985 Realschule, Geschwister Scholl-Schule, Konstanz
1985-1986 Berufsvorbereitungsjahr, Haus und Landwirtschaftliche Schule, Radolfzell
1986-1987 Berufsfachschule für Elektrotechnik, Zeppelin Gewerbeschule Konstanz

Wehrdienst: vom Wehrdienst befreit

Berufsausbildung:

1988-1991 Berufsausbildung zum Werbetechniker, Fa. Martin, Konstanz
1991 Gesellenprüfung zum Werbetechniker durch die Handwerkskammer
Freiburg
1991-1993 Anstellung als Werbetechniker, Fa. Martin, Konstanz

Schulische Weiterbildung:

1993-1994 Berufsaufbauschule, Zeppelin Gewerbeschule, Konstanz
1994-1996 Technische Oberschule, Hohentwiel Gewerbeschule Singen
1996 Hochschulreife

Hochschulstudium:

1996-2001 Biologiestudium an der Universität Konstanz
2001 Diplomarbeit mit dem Thema: „Charakterisierung eines putativen
Aminosäuretransporters aus *Uromyces fabae*“

Promotion:

2001-2005 Promotionsstudium an der Technischen Universität Darmstadt, Institut für
Botanik

10. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Darmstadt, 14. November 2005

.....

Mein Dank gilt...

Herrn Prof. Dr. Kluge und PD Dr. A. Schübler für die Überlassung des Themas, für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Diskussionsbereitschaft und die freien Arbeitsmöglichkeiten in einem guten Arbeitsklima

Mein besonderer Dank geht dabei an Herrn Dr. A. Schübler, der mich als Betreuer in die Forschung an *Geosiphon pyriformis* und an der arbuskulären Mykorrhiza eingeführt hat. Seine umfangreichen Kenntnisse zu diesem Thema, das Interesse an den Experimenten und seine Diskussionsbereitschaft waren die Grundlage für die Entstehung dieser Arbeit

Herrn Prof. Dr. Thiel für die Übernahme des Zweitgutachtens, für das stetige Interesse an meiner Arbeit, sowie für die Möglichkeit elektrophysiologische Messungen in seinem Labor durchführen zu können

Allen Mitgliedern der AG Schübler

Allen ehemaligen Mitglieder der AG Kluge, insbesondere Karin Faist und Monika Medina-España

Prof. Dr. Christine Stöhr und Stefanie

Den Mitgliedern der AG Thiel, insbesondere Dipl. Biol. Henrik von Rosenberg für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente mit *Xenopus*-Oozyten

Dr. Daniel Wipf und Michael Fitz an der Universität Bonn für die freundliche Aufnahme während meines Gastaufenthalts und für die Durchführung der Aufnahmemessungen in Hefe

Daniel, Elke, Frank, Markus, Norbert und Matthias

Allen Korrekturleserinnen und -lesern

Meinen Eltern, Großeltern, meiner Großtante und meinem Bruder

Allen meinen Freunden und Bekannten, auch außerhalb der Universität